



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | | |
|--|--|--|--|
| (51) Classification internationale des brevets⁵ : C12N 5/00, A61K 39/108, 39/112 C12N 15/31 | | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 90/11349 (43) Date de publication internationale: 4 octobre 1990 (04.10.90) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00183 (22) Date de dépôt international: 19 mars 1990 (19.03.90) | | (74) Mandataires: LEMOINE, Michel etc. ; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, bd des Batignolles, F-75008 Paris (FR). | |
| (30) Données relatives à la priorité: 89/03626 20 mars 1989 (20.03.89) FR | | (81) Etats désignés: AU, CA, US. | |
| (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE MERIEUX SOCIETE ANONYME [FR/FR]; 17, rue Bourgelat, F-69002 Lyon (FR). | | Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> | |
| (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): AUDONNET, Jean-Christophe [FR/FR]; 1, rue des Belges, F-26200 Montelimar (FR). BRUNEAU, Patrick [FR/FR]; 31, chemin des Fonds, F-69110 Ste-Foy-les-Lyon (FR). | | | |

(54) Title: VACCINES FOR COMBATTING SEPTICEMIC BACTERIA

(54) Titre: VACCINS CONTRE LES BACTERIES SEPTICEMIQUES

(57) Abstract

The bacteria expressing iron-regulated outer membrane proteins of which certain are siderophore or transferrin receptors can be used in a vaccinal preparation. Said bacteria are obtained from a culture in a medium in which the iron content is reduced to a level for obtaining an increased expression of said proteins, and in particular of receptors, sufficient to induce, when said bacteria are used in a vaccine, the formation of antibodies preventing the specific recognition of siderophores by their receptors.

(57) Abrégé

Les bactéries exprimant des protéines de la membrane externe régulées par le fer et dont certaines sont des récepteurs de sidérophores ou de transferrines, utilisables dans une préparation vaccinale, sont obtenues par culture dans un milieu dans lequel on réduit la teneur en fer à un niveau permettant d'obtenir une expression accrue desdites protéines, et notamment récepteurs, suffisante pour induire, lorsque lesdites bactéries sont utilisées dans un vaccin, la formation d'anticorps empêchant la reconnaissance spécifique des sidérophores par leurs récepteurs.

DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | |
|----|-----------------------------------|-----|---|----|-----------------------|
| AT | Autriche | ES | Espagne | MG | Madagascar |
| AU | Australie | FI | Finlande | ML | Mali |
| BB | Barbade | FR | France | MR | Mauritanie |
| BE | Belgique | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BF | Burkina Faso | GB | Royaume-Uni | NL | Pays-Bas |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | NO | Norvège |
| BJ | Bénin | IT | Italie | RO | Roumanie |
| BR | Brésil | JP | Japan | SD | Soudan |
| CA | Canada | KP | République populaire démocratique de Corée | SE | Suède |
| CF | République Centrafricaine | KR | République de Corée | SN | Sénégal |
| CG | Congo | LJ | Liechtenstein | SU | Union soviétique |
| CH | Suisse | LK | Sri Lanka | TD | Tchad |
| CM | Cameroun | LJU | Luxembourg | TG | Togo |
| DE | Allemagne, République fédérale d' | MC | Monaco | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark | | | | |

Vaccins contre les bactéries septicémiques

5 La présente invention a trait à des bactéries appartenant aux genres incluant des bactéries athogènes et exprimant en grandes quantités des protéines antigéniques de la membrane externe régulées par le fer.

10 Elle concerne également les procédés pour la production de ces bactéries.

15 Elle concerne encore des vaccins anti-bactéries septicémiques contenant à titre de principe actif des bactéries exprimant en grandes quantités des protéines antigéniques de la membrane externe régulées par le fer, ou des fragments de ces bactéries ou des antigènes exprimés par ces bactéries.

20 Elle concerne également d'autres vecteurs bactériens, viraux, ou autres, permettant d'exprimer ces protéines antigéniques, ainsi que des vaccins contenant ces protéines à titre de principe actif.

Elle concerne également des vaccins vivants recombinants, notamment bactériens ou viraux, exprimant ces protéines antigéniques dans l'organisme vacciné.

On sait qu'à l'exception de certains lactobacilles, le

fer est un nutriment nécessaire à toutes les formes vivantes, y compris les bactéries. Celles-ci ont besoin de fer pour pouvoir se multiplier dans la cellule hôte. L'aptitude de la bactérie à se multiplier *in vivo* constitue 5 un facteur essentiel de la virulence.

Bien que le fer soit présent en grandes quantités dans l'organisme humain, la bactérie ne dispose pour se multiplier que d'une quantité très restreinte de fer libre.

La très grande majorité du fer d'un hôte animal est, en 10 effet, intracellulaire (sous forme de ferritine, d'hémosidérine ou d'hème) et donc difficilement accessible. La faible quantité de fer présente dans les liquides corporels n'existe que sous forme de complexes extrêmement stables, constitués principalement avec deux glycoprotéines 15 chélatrices du fer : la transferrine dans le plasma et la lactoferrine dans les sécrétions. L'existence de ces glycoprotéines qui lient le fer avec force, mais de façon réversible, est nécessaire pour permettre son utilisation par les cellules, tout en empêchant sa précipitation sous 20 forme d'hydroxyde ferrique.

Le plasma contient des complexes de fer sous forme d'haptoglobine-hème, de cérouloplasmine, de ferritine, de lactoferrine et de transferrine.

La majeure partie du fer est véhiculée par les 25 transferrines. On distingue trois classes majeures de transferrine : la transferrine sérique, la lactoferrine et l'ovotransferrine.

La transferrine fixe environ 95 % du fer plasmatique et son taux de saturation est seulement d'environ 35 % chez un 30 individu sain.

La lactoferrine a un très faible taux de saturation en fer et elle conserve ses propriétés chélatrices dans une large gamme de pH ; sa présence dans toutes les sécrétions de l'organisme, c'est-à-dire au niveau des sites potentiels 35 d'invasion microbienne, impose une plus grande restriction en fer à ces endroits qu'ailleurs dans l'organisme.

La complexation du fer aux glycoprotéines a pour conséquence de ne laisser subsister qu'une très faible concentration de fer ferrique libre ($10^{-19} M$), qui est tout à fait insuffisante pour permettre la croissance normale des 5 bactéries.

Afin d'acquérir le fer dont elles ont besoin pour se multiplier chez l'hôte, les bactéries disposent d'un certain nombre de moyens.

Certains microorganismes semblent pouvoir obtenir leur 10 fer par un mécanisme impliquant une interaction directe entre la surface cellulaire bactérienne et les protéines liant le fer chez l'hôte. Ce mode d'acquisition direct ne concerne toutefois qu'un nombre très limité d'espèces. La plupart des bactéries, qu'elles soient pathogènes ou non, 15 combattent l'indisponibilité du fer, chez l'hôte ou dans certains environnements aérobies, en produisant des composés chélateurs du fer appelés sidérophores.

Les sidérophores sont constitués par des molécules de faible poids moléculaire qui forment des complexes 20 spécifiques et de très grande affinité avec l'ion ferrique. Leur biosynthèse est régulée par le fer et leur fonction est d'approvisionner la cellule bactérienne en fer.

Ces sidérophores possèdent une affinité extrêmement élevée pour l'ion ferrique (leur constante d'association est 25 d'environ $10^{30} M^{-1}$) qui leur permet de déplacer le fer associé aux protéines de l'hôte ou de solubiliser le fer ferrique précipité sous forme d'hydroxyde.

La plupart des sidérophores jusqu'ici identifiés appartiennent à deux classes chimiques : les phénolates- 30 catécholates (dérivés de l'acide 2,3 dihydroxybenzoïque) et les hydroxamates (dérivés de l'acide hydroxamique).

Le plus connu des sidérophores de la classe des phénolates est l'entérobactine excrétée par les bactéries des genres Escherichia, Klebsiella, Salmonella et Shigella. 35 L'entérobactine est constituée d'un trimère cyclique de la 2,3 dihydroxy-N-benz yl-L-sérine et est le composé chimique

qui possède la plus haute affinité connue pour l'ion ferrique ($K_a = 10^{52} M^{-1}$).

Plusieurs espèces entériques synthétisent un autre sidérophore hydroxamate, l'aérobactine. Ce sidérophore est, 5 en particulier, produit par des souches septicémiques ou invasives d'Escherichia coli comportant un plasmide de type Col V, de Salmonella typhimurium et de Shigella.

Cette biosynthèse des sidérophores par les bactéries est associée à la production de protéines au niveau de la 10 membrane externe dont certaines servent de récepteurs aux sidérophores ainsi que de mécanismes qui permettent le transport et le relargage du fer à l'intérieur de la bactérie. Ces protéines formées dans la membrane externe, souvent 15 désignées par le terme "IROMP" pour Iron Regulated Outer Membrane Protein (protéine de membrane externe régulée par le fer), ont pour caractéristique commune d'avoir une taille comprise entre 70 kDa et 90 kDa et d'être synthétisées aussi bien in vitro en milieu restreint en fer qu'in vivo au cours de l'infection.

20 Les protéines de la membrane externe, récepteurs de sidérophores, constituent donc le deuxième élément des systèmes dits de haute affinité pour l'acquisition bactérienne du fer (le premier élément étant constitué par les sidérophores).

25 A côté de ces systèmes de haute affinité, de nombreuses bactéries disposent de systèmes de transport de basse affinité qui leur permettent d'utiliser les formes polymérisées d'hydroxyde ferrique.

30 Les mécanismes d'assimilation du fer ont été particulièrement étudiés chez Escherichia coli qui est le microorganisme le mieux connu sur le plan génétique.

Le système endogène de haute affinité de transport du fer chez E. coli utilise le sidérophore, entérobactine. L'entérobactine est synthétisée et excrétée dans le milieu 35 lorsque E. coli est placée dans un environnement restreint en fer. Les complexes d'entérobactine ferrique sont alors

captés au niveau de la membrane externe (protéine Fep A de 81 kDa) et transportés vers le cytoplasme. Une fois internalisé, le fer est libéré par hydrolyse de l'entérobactine ferrique, puis réduit en fer ferreux.

5 Le système entérobactine de E. coli comprend au moins treize gènes. Sept gènes (ent) sont impliqués dans la biosynthèse du sidérophore et cinq gènes (fep) codent pour des protéines de transport.

En plus du système entérobactine, les souches 10 septicémiques d'E. coli excrètent et transportent un sidérophore hydroxamate, l'aérobactine.

Il a été découvert en 1979 par P.H. WILLIAMS (37) que certains plasmides de type Col V portaient les gènes du sidérophore aérobactine et de son récepteur situé dans la 15 membrane externe et appelé protéine Iut A (protéine de 74 kDa).

Bien que l'aérobactine ait une constante d'association avec l'ion ferrique inférieure à celle de l'entérobactine, elle est néanmoins douée de propriétés structurales qui augmentent sa capacité à récupérer le fer lié à la transferrine ou à la lactoferrine.

Depuis sa mise en évidence en 1979 par P.H. WILLIAMS, de très nombreuses études ont montré que le système de transport du fer par l'aérobactine jouait un rôle 25 déterminant dans la virulence des souches pathogènes d'E. coli et de nombreuses autres bactéries (GRIFFITHS et al (13)).

La présence du sidérophore aérobactine favorise fortement la virulence des souches pathogènes.

30 Si l'aérobactine est un chélateur moins puissant que l'entérobactine, il est par contre actif dans des conditions d'environnement beaucoup plus variées (l'entérobactine est très sensible à l'oxydation et aux variations de pH). L'aérobactine assure donc à la bactérie un degré 35 d'adaptation plus grand.

Par ailleurs, l'aérobactine stimule mieux la croissance

bactérienne et elle semble être excrétée beaucoup plus rapidement que l'entérobactine, probablement par suite d'une induction génétique préférentielle, lorsque E. coli est cultivée en présence d'un chélateur.

5 La bactérie acquiert, avec l'opéron aérobactine, un système de transport du fer extrêmement performant avec un nombre minimum de gènes supplémentaires, quatre gènes seulement pour la synthèse de l'aérobactine qui est un petit sidérophore simple, et un gène codant pour le récepteur de 10 la membrane externe. Les autres gènes nécessaires au transport des hydroxamates sont, en effet, constitutivement présents chez toutes les Escherichia coli.

15 L'expression de tous les gènes codant pour les protéines de membrane, récepteurs de sidérophores, et les sidérophores correspondants, est régulée par une seule protéine, Fur, qui agit comme un répresseur lorsque le fer est disponible en quantité suffisante. Cette régulation centrale est surimposée à une régulation individuelle qui module l'expression de chaque système selon les conditions 20 d'environnement.

Certains auteurs ont cultivé des bactéries, en vue d'augmenter l'expression d'IROMPs dans des milieux carencés en fer à l'aide de chélateurs chimiques, tels que le α , α' dipyridyl (A. BINDEREIF et al. : The cloacin receptor of Col 25 V-bearing Escherichia coli is part of the Fe 3+ aerobactin system, J. Bacteriol., 1982, 150, 1472-1475 ; C. MAROLDA et al. : Flanking and internal regions of chromosomal genes mediating aerobactin iron uptake system in enteroinvadive Escherichia coli and Shigella flexneri, J. General 30 Microbiology, 1987, 133, 2269-2278 ; A. BINDEREIF et al. : Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid col V, J. Bacteriol., 1983, 153, 1111-1113; De LORENZO et al. : Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid col V - K 30 in Escherichia coli K 12, J. 35 Bacteriol., 1986, 165, 570-578 ; P. WARNER et al. : col V-plasmid-specified aerobactin synthesis by invasive strains

of Escherichia coli, Infection and Immunity, 1981, 33, 540-545. E. GRIFFITHS et al. ont montré dans : Synthesis of aerobactin and a 76000 Dalton iron-regulated outer membrane protein by Escherichia coli K-12 - Shigella flexneri hybrids and by enteroinvasive strains of Escherichia coli, Infection and Immunity, 1985, 49, 67-71, que des souches entéroinvasives de E. coli produisent de l'aérobactine et une protéine de membrane externe de 76 K en culture réduite en fer en présence d'ovotransferrine.

10 Les connaissances récemment acquises sur les systèmes d'acquisition du fer par les bactéries ont permis l'exploration de nouvelles voies de lutte contre les bactéries pathogènes.

15 Il a été proposé de synthétiser des analogues de sidérophores qui soient toxiques pour la bactérie et puissent leurrer les systèmes de transport du fer pour entrer dans la cellule bactérienne. Mais ces chélateurs synthétiques ont une affinité pour le fer (III) moins élevée que les sidérophores naturels, et sont incapables de déplacer le fer des transferrines.

20 ROGERS a suggéré la formation de complexes entre l'aérobactine et des ions métalliques trivalents pour les utiliser comme antimétabolites vis-à-vis du complexe naturel entérobactine-Fe³⁺. Seuls les complexes formés avec le scandium (Sc³⁺) et l'indium (In³⁺) présentent une certaine

activité antibactérienne (ROGERS et al (26) ; ROGERS (27)).

Il a été également proposé d'adsorber les sidérophores de type phénolate qui sont des molécules aromatiques sur certaines protéines sériques, qui jouent alors le rôle de 5 molécule porteuse, permettant l'induction d'anticorps spécifiques dirigés contre le sidérophore.

C'est ainsi que BYERS (5) décrit un vaccin contre le sidérophore phénolate produit par Aeromonas hydrophila (bactérie responsable de septicémie chez l'homme et chez le 10 poisson), qui a été expérimenté chez les poissons. Le sidérophore a été couplé de façon covalente à l'albumine humaine ou à l'albumine bovine. Des poissons immunisés avec ces préparations produisent des anticorps qui réagissent contre le sidérophore. Il n'est, toutefois, pas précisé si 15 les anticorps formés sont aptes à neutraliser le sidérophore.

On a pensé, également, empêcher le captage des sidérophores par les bactéries par des anticorps qui seraient spécifiquement dirigés contre les récepteurs de 20 sidérophores.

BOLIN et al (4) rapportent les résultats d'une étude qui fait état d'une certaine immunisation passive avec des anticorps dirigés contre les protéines de la membrane externe régulées par le fer, protégeant des dindons d'une 25 septicémie par Escherichia coli.

Toutes les tentatives entreprises en vue de la mise au point d'un vaccin efficace ont, toutefois, jusqu'ici échoué, devant les difficultés à pouvoir faire exprimer par une bactérie les protéines de membrane régulées par le fer à un 30 niveau suffisant dans la culture bactérienne.

La présente invention permet de surmonter cette difficulté, en proposant l'utilisation dans un vaccin, à titre de principe actif, de bactéries exprimant en grandes quantités des protéines de membrane régulées par le fer et plus 35 particulièrement, les récepteurs de sidérophores à un niveau suffisant pour induire la formation d'anticorps qui

empêchent la reconnaissance spécifique des sidérophores par leurs récepteurs.

Un des buts de l'invention est de fournir des bactéries exprimant des protéines de la membrane externe régulées par le fer (IROMPs), utilisables comme antigènes protecteurs.

Un autre but de l'invention est de proposer la synthèse des protéines de la membrane externe régulées par le fer de bactéries septicémiques par recombinaison génétique.

Un autre but de l'invention est de fournir en grande quantité les IROMPs et notamment les protéines Iut A et Fep A, récepteurs des sidérophores, aérobactine et entérobactine chez Escherichia coli et d'autres familles, par synthèse de ces protéines par recombinaison génétique.

Un autre but encore de l'invention est de fournir des vaccins qui contiennent, à titre de principe actif, des bactéries ou des fragments de ces bactéries qui présentent dans leur membrane externe de grandes quantités d'IROMPS et notamment des protéines Iut A et Fep A, obtenues par recombinaison génétique ou par d'autres procédés.

Un autre but encore de l'invention est de fournir des vaccins qui contiennent, à titre de principe actif, des IROMPs, par exemple des protéines Iut A et/ou Fep A ou des préparations d'anticorps incorporant ces protéines.

La présente invention utilise donc des bactéries exprimant des protéines de la membrane externe régulées par le fer et dont certaines sont des récepteurs de sidérophores, utilisables dans une préparation vaccinale.

Les bactéries conformes à l'invention sont caractérisées en ce qu'elles expriment des quantités accrues de ces protéines de la membrane externe, et plus particulièrement des récepteurs de transferrines et notamment des récepteurs de sidérophores, pour induire, lorsque ces protéines sont utilisées dans un vaccin, la formation d'anticorps empêchant la fonction de reconnaissance spécifique par les récepteurs, et arrêtant par là même l'alimentation en fer de la bactérie pathogène.

10

Les bactéries utilisées sont, de préférence, des entérobactéries et on préfère qu'elles excrètent des sidérophores entérobactine et/ou aérobactine.

5 Les bactéries sont choisies, de préférence, dans le groupe constitué par Escherichia coli, Klebsiella, Salmonella typhimurium, Shigella.

Les bactéries excrètent, de préférence, ensemble les sidérophores aérobactine et entérobactine.

Conformément à l'invention, et selon un premier mode de 10 réalisation, les bactéries sont obtenues par culture de souches existantes dans la nature ou disponibles dans les laboratoires ou collections dans un milieu minimum dans lequel la disponibilité du fer est réduite à un niveau permettant une expression accrue satisfaisante des protéines de 15 membrane. La culture est effectuée, de préférence, en présence d'une protéine forte chélatrice de fer (III) telle que les lactoferrines, chélateurs qui présentent l'avantage d'établir une restriction en fer ayant les mêmes caractéristiques que celle qui existe *in vivo*.

20 L'invention a également pour objet un procédé de production de telles bactéries destinées à être utilisées pour la préparation de vaccins, caractérisé en ce que l'on cultive lesdites bactéries dans un milieu de culture contenant une protéine chélatrice du fer (III) telle que les 25 transferrines, et notamment lactoferrines.

On peut utiliser, comme milieu minimum, celui qui a été décrit par exemple par SIMON et TESSMAN (30).

30 Ce mode de réalisation reste, toutefois, d'une mise en oeuvre délicate, car il faut, avec les chélateurs du fer généralement utilisés, réduire suffisamment la teneur en fer dans le milieu de culture, pour obtenir une expression suffisante des protéines de la membrane externe. Il reste souvent de faibles quantités de fer qui empêchent l'expression des protéines de membrane (fer provenant, par 35 exemple, du fermenteur ou des tuyauteries qui sont, en

général, en acier inoxydable). On est, alors, obligé d'avoir recours à des procédés relativement compliqués, pour abaisser la teneur en fer à un niveau qui permette l'expression des protéines de la membrane externe des 5 bactéries, et dont la mise en oeuvre est coûteuse.

Selon un second mode de réalisation de l'invention, qui est aussi le mode de réalisation préféré, les bactéries exprimant, en grandes quantités, les protéines de la membrane externe, récepteurs de sidérophores, sont transformées 10 par des plasmides recombinants.

La synthèse des protéines de la membrane externe, récepteurs de sidérophores ou de transferrine, par recombinaison génétique, présente, en effet, de nombreux avantages :

15 - elle permet d'avoir une expression importante de ces protéines, indépendamment de la concentration en fer du milieu de culture,

20 - elle permet d'étudier les réactions immunitaires directement dirigées contre ces protéines, en excluant tout autre constituant de la souche d'origine,

- elle est la solution la plus économique pour exprimer des protéines de membrane dans un environnement où le fer est toujours présent (fermenteurs, tuyauteries et équipements divers en acier inoxydable).

25 Si le demandeur s'est plus particulièrement intéressé à la synthèse des protéines Iut A et Fep A, récepteurs des sidérophores aérobactine et entérobactine chez E. coli, on comprendra que les techniques de recombinaison génétique décrites ci-après, s'appliqueront par analogie à la synthèse 30 des protéines de membrane (IROMPs), récepteurs des sidérophores, (aérobactine et entérobactine) ou de transferrines de bactéries pathogènes autres que E. coli.

L'invention concerne donc aussi la préparation des protéines Iut A et/ou Fep A d'E. coli par recombinaison génétique.

La protéine Iut A peut être synthétisée par un procédé qui consiste, notamment :

- à isoler le plasmide ou le chromosome de souches d'E. coli de Salmonelles, Shigelles ou Klebsielles pathogènes qui 5 porte l'opéron aérobactine,
- à séparer du plasmide ou chromosome un fragment qui contient le gène iut A,
- à liguer ledit fragment avec un vecteur de clonage,
- à insérer les clones ayant intégré le gène iut A dans 10 un vecteur d'expression (par exemple le plasmide GTI 001),
- et à exprimer la protéine IutA par culture des clones.

La protéine Fep A est obtenue :

- en isolant d'un plasmide (par exemple le plasmide pMS 15 101 construit par LAIRD et YOUNG (19)) ou d'un chromosome bactérien, E. coli, Salmonelles ou Klebsielles un fragment portant le gène fep A,
- en clonant ledit fragment dans un vecteur de clonage,
- en insérant le gène fep A dans un vecteur 20 d'expression, de préférence, dans le vecteur utilisé pour l'expression de la protéine Iut A (plasmide GTI 001),
- et en faisant exprimer la protéine Fep A par culture des clones.

Les vecteurs d'expression des protéines Iut A et/ou Fep 25 A peuvent être des bactéries et on préférera utiliser E. coli dont les systèmes d'expression sont les mieux connus. On peut cependant également utiliser d'autres vecteurs, notamment viraux ou constitués de levures, dont les constructions peuvent être mises en oeuvre par l'homme de l'art.

Les clones bactériens exprimant les protéines Iut A et/ou Fep A peuvent être multipliés, dans un milieu approprié, à une température suffisamment basse pour empêcher ou limiter l'expression, en général inférieure à 5 32°C. L'expression est ensuite induite par élévation de la température, par exemple à 42°C pendant environ 4 heures, pour induire l'expression des gènes iut A et fep A.

On obtient ainsi des bactéries qui intègrent les protéines Iut A et Fep A ainsi que leurs précurseurs proIut 10 A et proFep A, se présentant sous la forme d'inclusions cytoplasmiques de grande taille.

Ces bactéries utilisées, dans un vaccin, à titre de principe actif, induisent la formation d'anticorps dirigés contre les protéines Iut A et Fep A qui empêchent la 15 reconnaissance par ces protéines de leurs sidérophores respectifs aérobactine et entérobactine, réduisant fortement par là même, l'alimentation en fer de la bactérie et bloquant sa multiplication.

L'invention concerne donc également des vaccins qui 20 contiennent, à titre de principe actif, des bactéries recombinantes exprimant des protéines de la membrane externe régulées par le fer.

Elle a plus particulièrement pour objet des vaccins qui contiennent, à titre de principe actif: des bactéries recombinantes ou des fragments de ces bactéries, notamment des fragments de membranes qui intègrent des protéines Iut A 25 et/ou Fep A et/ou leurs précurseurs proIut A et/ou proFep A; ou encore les protéines Iut A et/ou Fep A et/ou leurs précurseurs, par exemple extraits du cytoplasme ou de la 30 membrane externe des bactéries recombinantes.

Dans un autre mode de mise en oeuvre, l'invention a pour objet des vaccins qui contiennent, à titre de principe actif: des bactéries homologues des bactéries septicémiques, ou des fragments de ces bactéries, cultivées dans un milieu 35 à restriction de fer, et qui intègrent, en quantités

accrues, des protéines Iut A et/ou Fep A et/ou encore leur précurseurs ; les protéines Iut A et/ou Fep A (et/ou leurs précurseurs) convenablement extraites.

De préférence, ces derniers vaccins sont préparés à 5 base de bactéries cultivées dans un milieu contenant un chélateur de fer (III) fort de type protéique et notamment transferrine, lactoferrine ou ovotransferrine.

L'invention sera bien comprise à la lecture de la 10 description qui suit, se référant aux figures ci-annexées sur lesquelles :

la figure 1 représente le profil protéique obtenu par électrophorèse d'un clone exprimant la protéine Iut A,

la figure 2 représente le profil protéique obtenu par électrophorèse d'un clone exprimant la protéine Fep A.

15 Les abréviations utilisées dans la suite du texte ont les significations qui suivent :

| | |
|------------------|--------------------------------------|
| Amp ^R | ampicilline-résistant |
| Clo ^S | cloacine-sensible |
| dATP | désoxy-adénosine triphosphate |
| 20 EDTA | acide éthylène-diamine-tetraacétique |

| | | |
|-------------------|--|---|
| | | 15 |
| Ent | | entérobactine |
| E.O.P.S. | | exempt d'organismes pathogènes spécifiques |
| IPTG | | isopropyl- β -thiogalactopyranoside |
| 5 kpb | | kilopaire de bases |
| LB | | luria broth |
| OMP | | protéine extra-membranaire (outer membrane protein) |
| PAGE | | électrophorèse en gel de polyacrylamide |
| 10 pb | | paire de bases |
| PBS | | tampon phosphate (phosphate buffered saline) |
| SDS | | sodium dodecyl sulfate |
| ST | | Simon et Tessman |
| 15 TEMED | | N,N,N',N'-tétraméthylène diamine |
| Tris | | tris-hydroxy-aminométhyl-méthane |
| tetr ^r | | tétracycline-résistant |

MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS

20 1. Souches

On a rassemblé dans le tableau I les souches utilisées. Les souches pathogènes mises en oeuvre sont des souches de septicémies chez des veaux ou des poulets et proviennent de la souchothèque RHONE-MERIEUX.

25 Les souches hôtes utilisées pour le clonage, le séquençage et l'expression dérivent toutes de Escherichia coli K 12.

On peut, sans difficultés, remplacer ces souches, par d'autres souches septicémiques sauvages ou des souches de 30 laboratoire

2. Plasmides

L'origine et les caractéristiques des plasmides utilisés pour le clonage et l'expression sont présentées dans le tableau II.

35 3. Milieux

16

Milieu minimum de SIMON et TESSMAN (30).

Sa composition est la suivante :

| | | | |
|----|---------------------------------------|---------|--------|
| | NaCl | 5,8 | g |
| | KCl | 3,7 | g |
| 5 | CaCl ₂ , 2H ₂ O | 0,15 | g |
| | MgCl ₂ , 6H ₂ O | 0,10 | g |
| | NH ₄ Cl | 1,10 | g |
| | Na ₂ SO ₄ | 0,142 | g |
| | KH ₂ PO ₄ | 0,272 | g |
| 10 | Tris | 11,20 | g |
| | H ₂ O qsp | 1000 ml | pH 7,4 |

L'unique source de carbone est constituée par du succinate de sodium ajouté à la concentration finale de 10 g/l.

Pour établir une restriction en fer dans ce milieu, on 15 a ajouté de l'ovotransferrine (SIGMA) à la concentration finale de 250 µg/ml (Des concentrations supérieures à 500 µg/ml sont possibles).

Le milieu témoin riche en fer est obtenu par addition de FeCl₃, 6H₂O (MERCK) à la concentration finale de 40 µM.

20 Milieu minimum M9 MANIATIS (23)

| | | | |
|----|----------------------------------|---------|--------|
| | Na ₂ HPO ₄ | 6,0 | g |
| | KH ₂ PO ₄ | 3,0 | g |
| | NaCl | 0,5 | g |
| | NH ₄ Cl | 1,0 | g |
| 25 | H ₂ O qsp | 1000 ml | pH 7,4 |

on ajoute à ce milieu de base :

Mg SO₄ 1M 2 ml/1000 ml

glucose 20 % 10 ml/1000 ml

CaCl₂ 1M 0,1 ml/1000 ml

30 - Milieu riche LB (MANIATIS et al., (23))

Bactotryptone 10 g

Extrait de levure 5 g

NaCl 5 g

H₂O qsp 1000 ml pH 7,4

35 - Milieu riche BTS (BIO MERIEUX)

Biotryptase 17 g

17

| | | | |
|----|--|---------|--------|
| | Biosoyase | 3 | g |
| | NaCl | 5 | g |
| | K ₂ HPO ₄ | 2,5 | g |
| | glucose | 2,5 | g |
| 5 | H ₂ O qsp | 1000 ml | pH 7,3 |
| | - Milieu riche BHI (Coeur-cervelle BIO MERIEUX) | | |
| | Infusion de cervelle de veau | 200 | g |
| | Infusion de coeur de boeuf | 250 | g |
| | Bio-gelytöne | 10 | g |
| 10 | NaCl | 5 | g |
| | Na ₂ HPO ₄ | 2,5 | g |
| | glucose | 2,0 | g |
| | H ₂ O qsp | 1000 ml | pH 7,4 |
| | - Milieu riche "M9 SP" pour l'expression | | |
| 15 | milieu : | | |
| | SP (Tryptone 3,2 % ; Extrait de levure 2 %) | 100 ml | |
| | M9 (6,6 X concentré) filtré sur filtre de 0,22 µm | 15 ml | |
| | (Millipore) | | |
| | Mg SO ₄ 100 mM | 1,5 ml | |
| 20 | FeCl ₃ 0,1 mM | 1,5 ml | |
| | Vitamine B1 (solution à 5 %) | 1,5 ml | |
| | Les milieux solides ont la même composition que les milieux liquides correspondants et contiennent 12 g d'agar par litre de milieu. | | |
| 25 | Les antibiotiques sont utilisés dans les milieux solides et liquides aux concentrations finales suivantes : | | |
| | Ampicilline | 25 | µg/ml |
| | Tétracycline | 12,5 | µg/ml |
| 30 | L'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) est ajouté, selon les cas, à une concentration finale allant de 0,05 mM à 0,4 mM. | | |
| | La stérilisation des milieux liquides et solides est effectuée par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. | | |
| 35 | Les solutions d'antibiotiques, de vitamine B1, de succinate de sodium, de M9 6,6 X, de MgSO ₄ , de FeCl ₃ , d'IPTG et d'ovotransferrine sont réalisées sous forme de solutions | | |

stocks concentrées, et stérilisées par filtration sur filtre de porosité 0,22 µm (Millipore).

Après stérilisation, les milieux de culture sont conservés à température ambiante.

5 Les solutions stocks d'antibiotiques, d'IPTG et d'ovotransferrine sont conservées à -20°C.

Les autres solutions sont gardées à + 4°C.

II METHODES

1. Cultures bactériennes

10 A l'exception des clones abritant les constructions réalisées dans le vecteur d'expression pGTI 001, qui sont cultivés à + 30°C, toutes les cultures sont effectuées à + 37°C, sous agitation, pendant 18 heures.

15 Lorsque cela est nécessaire, la croissance bactérienne est estimée par la mesure de la turbidité de la suspension à 600 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre BECKMAN DU 40.

Les cultures sont habituellement réalisées sous un volume de 2 ml après ensemencement avec une colonie. Les cultures sous un plus grand volume (20 ml à 1000 ml) sont 20 réalisées par ensemencement au 1/100ème avec une préculture en phase stationnaire.

2. Sensibilité vis-à-vis des bactériocines

Les productions de cloacine DF 13 et de colicine B sont réalisées respectivement avec les souches Enterobacter cloacae DF 13 et Escherichia coli 1300 selon la méthode décrite par DE GRAAF (DE GRAAF et al (8) et (9)).

Ces souches sont cultivées à + 37°C, en milieu BHI, jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0,5 (1 cm, 600 nm). On ajoute alors au milieu de culture de la mitomycine 30 C, de façon à avoir une concentration finale de 1 µg/ml, ce qui permet l'induction de la synthèse des bactériocines. La culture est continuée pendant 6 heures, à + 37°C, jusqu'à la phase de lyse. Les corps bactériens sont centrifugés (8000 g, 30 mn, + 4°C) et le surnageant est récolté. On additionne 35 alors lentement, à + 4°C, du sulfate d'ammonium jusqu'à ce que la concentration atteigne 365 g/l.

Le surnageant est repris en tampon phosphate 0,05 M, pH 7,0 et dialysé contre plusieurs bains successifs de ce tampon. Le dialysat est filtré sur 0,22 µm (Millipore) et conservé à - 20°C.

5 Environ 10^9 bactéries du clone étudié sont étalées sur une gélose LB contenant l'antibiotique de sélection approprié. Lorsque le liquide du dépôt a été complètement absorbé, on dépose au centre de la boîte de Petri 75 µl de la solution de bactériocine. Lorsque cette goutte a elle-
10 même séché, la boîte de Petri est placée à l'étuve (+ 30°C ou + 37°C selon les cas) pendant 18 heures. Les clones qui présentent une inhibition de croissance au niveau du dépôt ont acquis la sensibilité à la bactériocine. Les clones résistants à l'action toxique des bactériocines présentent
15 au contraire un tapis bactérien uniforme.

3. Préparation d'antisérum dirigés contre les protéines de la membrane externe régulées par le fer

Le protocole utilisé reproduit celui qui a été décrit par BOLIN et JENSEN (4).

20 Les protéines de la membrane externe régulées par le fer sont séparées par électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide, en présence de dodécyl sulfate de sodium.

Après coloration des gels, la bande contenant l'IROMP devant servir à l'immunisation est découpée, puis broyée en
25 présence d'eau distillée, par passages successifs à travers des aiguilles de diamètre de plus en plus faible.

30 Ce broyat est injecté à des lapins E.O.P.S. de souche White New Zealand, provenant de l'élevage de la société Rhône-Mérieux, selon le protocole présenté dans le tableau III.

Pour éliminer les anticorps dirigés contre les autres protéines de la membrane externe, les lipopolysaccharides et les autres antigènes de Escherichia coli, les sérum récoltés chez les lapins immunisés sont adsorbés avec une
35 souche d'Escherichia coli n'exprimant pas d'IROMPs.

A chaque ml de sérum, on ajoute environ 10^{10} corps

20

bactériens inactivés par la chaleur pendant 30 mn à 100°C, et on incube le mélange à + 37°C pendant 1 heure.

Après centrifugation, le sérum surnageant est récupéré et filtré sur filtre de porosité 0,22 µm (Millipore).

5 Il est conservé à - 20°C.

5. Extraction des protéines de la membrane externe.

La technique utilisée pour extraire les protéines de la membrane externe dérive des techniques décrites par VAN TIEL-MENKVELD et al. (36) et par FISS et al. (12)

10 Après centrifugation, le culot bactérien est remis en suspension dans du tampon Tris/HCl 0,2M pH 8,0 de façon à obtenir une densité optique d'environ 10. Les cellules bactériennes sont alors éclatées par sonication en faisant agir les ultrasons 3 fois 3 minutes en maintenant la suspension bactérienne sur un bain glace-éthanol.

15 Les débris cellulaires et les bactéries intactes sont éliminé par centrifugation à 5000 g pendant 20 mn, à + 4°C.

20 Les membranes bactériennes en suspension dans le surnageant sont récupérées par ultracentrifugation à 110 000 g pendant 60 minutes à + 4°C.

Le culot membranaire est repris par 5 ml du tampon d'extraction décrit par SCHNAITMAN (29) : Triton X-100 2 % ; MgCl₂ 10 mM ; Tris/HCl 50 mM pH 8,0.

25 On incube 30 minutes, à température ambiante, en agitant toutes les 5 minutes. Au cours de l'incubation, les protéines de la membrane cytoplasmique sont préférentiellement solubilisées par le Triton X-100. Les membranes externes sont récupérées par une nouvelle ultracentrifugation (110 000 g, 60 mn, + 4°C). Le culot obtenu est lavé 3 fois en eau distillée, resuspendu finalement dans 1 ml d'eau distillée et congelé à - 20°C pour conservation.

6. Dosage des protéines.

La concentration protéique des extraits membranaires 35 est mesurée par une méthode colorimétrique dérivée de celle publiée par LOWRY et al. (20).

21

A 0,5 ml de la solution protéique à doser, sont ajoutés 2,5 ml de la solution suivante :

| | | |
|---|---|------|
| | Solution de CuSO ₄ à 1 % | 1 ml |
| | Solution de tartrate de sodium à 2 % | 1 ml |
| 5 | Solution de carbonate de sodium à 2% en NaOH 0,1N | qsp |

Après incubation de 10 minutes à température ambiante, on ajoute 0,25 ml de réactif de Folin (Merck) à 50 %.

On incube 30 minutes, à température ambiante, et on 10 mesure la densité optique de la coloration bleue, qui s'est développée, à 779 nm.

On détermine la concentration protéique des échantillons à l'aide d'une gamme étalon préparée avec de l'albumine sérique de boeuf.

15 La densité optique est proportionnelle à la concentration protéique dans l'intervalle de 5 à 200 µm/ml.

7. Technique d'analyse de la composition protéique des membranes externes : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes.

20 Les gels de polyacrylamide sont préparés selon les caractéristiques décrites par LUGTENBERG et al. (21).

Le gel d'alignement a la composition suivante :

acrylamide-bisacrylamide (30/0,8 p/p) 5 % ; Tris/HCl 130 mM pH 6,8 ; SDS 3,5 mM ; persulfate d'ammonium 44 mM.

25 TEMED 8mM.

Le gel de séparation a la même composition que le gel d'alignement, sauf pour la concentration en acrylamide/bisacrylamide (8 ou 10 %) et en tampon Tris/HCl 380 mM pH 8,8.

30 Le tampon de migration utilisé a la composition suivante :

glycine 14,4 g

Tris 3,0 g

SDS 1,0 g

35 H₂O qsp 1000 ml pH 8,3.

Les extraits à analyser ou à purifier par

électrophorèse sont dilués dans un volume au moins égal du tampon de dissociation suivant : Tris/HCl 100 mM pH 6,8 ; glycérol 20 % ; SDS 70 mM, β -mercaptop-éthanol 100 mM ; Bleu de bromophénol 75 μ M.

5 Les extraits ainsi dilués sont chauffés à 100°C pendant 5 minutes.

Pour l'analyse de la composition protéique de la membrane externe, on dépose 30 à 50 μ g de protéines par puits.

10 Pour les électrophorèses préparatives, on dépose jusqu'à 2 mg de protéines dans le puits préparatif unique.

La migration s'effectue à + 14° C pendant 5 heures à 160 V ou 14 heures à 60 V (Appareil LKB à gel vertical). Pour augmenter la résolution des protéines de la membrane externe régulées par le fer, certaines électrophorèses ont 15 été réalisées sous une tension de 100 V pendant 16 heures. A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont fixées et colorées pendant 30 minutes à température ambiante par du bleu de Coomassie 1,2 mM dans un mélange méthanol/acide acétique/eau (50 : 10 : 50 v/v/v). Le colorant non fixé est 20 éliminé par plusieurs bains successifs de méthanol/acide acétique/eau (40 : 15 : 145 v/v/v) à 37°C. Une fois décoloré, le gel est photographié, puis séché.

Les profils protéiques des membranes externes de chaque souche peuvent être ensuite analysés par densitométrie 25 (Densitomètre laser LKB ULTROSCAN).

8. Détection et analyse des anticorps anti-IROMPs

La présence d'anticorps spécifiques anti-IROMPs est recherchée par la technique ELISA en microplaques (ENGWALL et PERLMANN (10) ; COULTON (7)). Les antigènes couplés à la 30 phase solide sont des fractions très enrichies en protéine proFep A ou en protéine proIut A.

La révélation des anticorps anti-IROMPs se fait au moyen d'un conjugué anti IgG de lapin (ou anti IgG de poulet) couplé à la peroxydase (Nordic). Le substrat 35 employé est l'orthophénylène-diamine. La lecture des densités optiques s'effectue à 492 nm.

- Technique du "Western-blotting" (ou "immunobuvardage")

Les protéines séparées par électrophorèse en gel de polycrylamide en présence de SDS sont transférées sur membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF 0,45 µm Millipore) selon la technique décrite par TOWBIN et al. (34).

Le transfert est réalisé sous 24 V pendant 1 heure avec un appareil BIOLYON en utilisant les tampons anodique et cathodique suivants :

| | | |
|----|-----------------------------|-----------------------------|
| 10 | Tampon anodique | Tampon cathodique |
| | Tris 0,3 g | Tris 0,3 g |
| | glycine 1,44 g | glycine 1,44 g |
| | Méthanol 100 ml | SDS 0,1 g |
| | H ₂ O qsp 500 ml | H ₂ O qsp 500 ml |

15 Après transfert, la membrane de PVDF est saturée pendant une heure à + 37°C en tampon PBS contenant 1 % de lait écrémé.

La membrane est ensuite découpée en bandes correspondant aux pistes d'électrophorèse.

20 Les sérum à étudier sont dilués dans du tampon PBS contenant 1 % de lait écrémé, puis mis en contact avec les bandes de membrane (4 ml de sérum dilué par bande).

Après incubation d'1 heure à + 37°C sous agitation douce, on effectue 3 lavages de 20 mn en tampon PBS contenant 2 % de lait écrémé, à température ambiante.

Un conjugué anti-Ig G couplé à la peroxydase, dilué au 1/1000ème en PBS contenant 1 % de lait écrémé, est ajouté à raison de 3 ml par bande.

30 Après incubation d'1 heure à + 37°C sous agitation douce, on effectue 3 lavages de 20 mn, à température ambiante, en tampon PBS.

On ajoute alors le substrat diaminobenzidine dilué à 0,1 % en eau physiologique pH 7,15 additionné extemporanément de 0,1 % H₂O₂ 30 volumes. Des bandes de 35 couleur marron apparaissent alors (en 5 à 20 mn) au niveau des protéines reconnues par les anticorps présents dans le

sérum étudié.

La membrane est ensuite lavée en eau distillée et séchée.

9. Technique de préparation de l'ADN plasmidique

5 Les grands plasmides abrités par les souches pathogènes sont extraits selon la technique publiée par KADO et al. (16).

10 Les plasmides obtenus au cours des différentes étapes du clonage, du sous-clonage, et des constructions dans le vecteur d'expression sont extraits selon la technique de BIRNBOIM (BIRNBOIM et DOLY) (3). L'ADN plasmidique obtenu après les extractions préparatives réalisées avec l'une ou l'autre technique est purifié sur gradient de chlorure de césium (MANIATIS et al. (23)).

15 Une fois purifiés, les plasmides sont repris en tampon Tris 10 mM ; EDTA 1mM pH 8,0, de façon à avoir une concentration finale de 1 µg d'ADN/µl, et congelés à -20°C pour conservation.

10. Méthodes d'analyse et de modification de l'ADN

20 Toutes les techniques employées pour le clonage, la digestion de l'ADN, l'analyse des fragments de restriction en gel d'agarose, la modification des extrémités des fragments de restriction, l'hybridation par sonde radioactive après transfert de l'ADN sur membrane de nitrocellulose, 25 sont celles décrites par MANIATIS (MANIATIS et al. (23)). L'ADN a été séquencé et les oligonucléotides synthétisés selon des méthodes particulières.

11. Séquençage de l'ADN

30 Les gènes à séquencer sont sous-clonés dans les vecteurs M13 mp 18 et mp 19 (YANISCH-PERRON et al. (38)) et séquencés selon la technique de terminaison de chaîne par les didésoxynucléotides (SANGER et al. (28)). Le marquage des différentes chaînes est effectué avec du ³⁵S dATP (AMERSHAM).

35 Le séquençage proprement dit est réalisé en utilisant les réactifs et les enzymes de kits de séquençage Amersham

et Sequenase (USB). Les électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence d'urée sont effectuées sur un appareil Sequi-Gen (BioRad).

Le traitement des données de séquence est réalisé à 5 l'aide du logiciel Microgénie (Beckman).

12. Synthèse des oligonucléotides

Les différents oligonucléotides nécessaires aux constructions dans les vecteurs d'expression ou aux mutagénèses sont synthétisés selon la technique des cyano-éthyl-phosphoramidites sur un appareil Applied Systems 381-A. 10

Ces oligonucléotides sont utilisés directement après déprotection et précipitation à l'éthanol.

13. Technique de mutagénèse dirigée

La mutagénèse est réalisée selon la technique décrite 15 par ECKSTEIN (TAYLOR et al. (33) ; NAKAMAYE et ECKSTEIN (24)) au moyen du kit de mutagénèse dirigée commercialisé par la société Amersham.

RESULTATS

1. ISOLEMENT ET ANALYSE DES GENES iut A

20 La présence de l'opéron aérobactine a été recherchée sur les plasmides portés par les souches 15393, 15972 et 16003.

Après avoir été purifiés sur gradient de chlorure de césium, ces plasmides ont été digérés par les enzymes de 25 restriction Bam HI, Hind III, Pvu et Sal I (Boehringer). Les différents fragments de restriction de chaque plasmide ont été séparés sur gel d'agarose à 0,8 % et transférés sur une membrane de nitrocellulose selon la technique du "Southern blot" (SOUTHERN (31)). Ces fragments ont été ensuite 30 hybridés avec deux sondes radioactives (marquées au ^{32}P par déplacement de coupure) préparées à partir de fragments de restriction du plasmide pABN1 portant l'opéron aérobactine de pCol V-K30, (BINDEREIF et NEILANDS (2)). Il a été trouvé que le gène codant pour le récepteur IutA se trouve chez 35 tous les plasmides sur un fragment de restriction Bam HI-Bam HI de 6,6 kb. Ces résultats confirment les travaux des

auteurs qui ont sous-cloné ce gène à partir d'un fragment équivalent de pCol V-K30 (KRONE et al. (17)).

- Clonage des fragments d'ADN plasmidique portant le gène iut A

5 Les plasmides des souches 15393, 15972 et 16003 ont été digérés par l'enzyme de restriction Bam HI. Après électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 %, la bande de gel contenant le fragment de taille 6,6 kb de chaque plasmide a été découpée et l'ADN a été électroélue.

10 Les trois fragments Bam HI-Bam HI 6,6 kb ont été ligués séparément dans le vecteur pAT 153 digéré par Bam HI. Les trois mélanges de ligation ont servi à transformer des bactéries HB 101 compétentes (Tableau IV).

15 L'ADN des clones ampicilline résistants, tétracycline sensibles a été extrait (par la technique de BIRNBOIM et DOLY) et digéré par Bam HI pour vérifier la taille de l'insert. Les clones ayant intégré le fragment de 6,6 kb ont été sélectionnés sur la base de leur sensibilité à la cloacine DF 13.

20 Pour chaque plasmide de départ, un clone sensible à la cloacine a été retenu pour les analyses et les constructions ultérieures. Il s'agit des clones :

Souche 15393 clone HB 101 p 5-15

Souche 15972 clone HB 101 p P-13

25 Souche 16003 clone HB 101 p 4-18

- Analyse des clones

Etude de l'expression du récepteur Iut A

Le fait d'avoir pu sélectionner les clones recherchés au moyen d'un test de sensibilité à la cloacine montre qu'il y a une expression du récepteur à la cloacine et à l'aérobactine. L'expression du gène iut A porté par le fragment Bam HI-Bam HI 6,6 kb est probablement sous la dépendance d'un promoteur faible situé sur ce fragment (KRONE et al. (17)) et non dépendante de la concentration en fer comme l'est le promoteur principal de l'opéron aérobactine. En effet, la sensibilité à la cloacine est mise

en évidence par culture sur gélose LB-ampicilline riche en fer.

Pour étudier le niveau d'expression du récepteur Iut A, les différents clones ont été cultivés en milieu LB-ampicilline (pendant une nuit à + 37°C) en présence ou non d'ovotransferrine (500 µg/ml).

Les protéines de la membrane externe des trois clones ont été extraites et analysées sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

10 Quelles qu'aient été les conditions de culture, il n'a pas été possible d'observer l'expression d'une protéine surnuméraire de 76 kDa chez les clones sensibles à la cloacine.

- Cartes de restriction

15 L'ADN plasmidique des clones 4-18, 5-15 et P-13 a été extrait en grande quantité et purifié sur gradient de chlorure de césium.

20 Les cartes de restriction des trois fragments Bam HI-Bam HI 6,6 kb clonés ont été établies avec les enzymes Bgl II, Bst E II, Cla I, Eco RI, Kpn I, Pst I, Pvu II et Sma I.

Ces trois cartes sont rigoureusement identiques entre elles et correspondent à la carte de restriction du fragment Bam HI-Bam HI 6,6 kb de l'opéron aérobactine de p ColV-K30 déduite des cartes publiées par BINDEREIF et NEILANDS (1,2) 25 et KRONE et collaborateurs (17).

Ces quatre cartes sont présentées sur le Tableau V.

- Séquençage des gènes iut A

30 Lors de la comparaison des cartes de restriction des trois fragments Bam HI-Bam HI 6,6 kb avec la carte de restriction déduite de la séquence du gène iut A (KRONE et al. (18)), il est apparu que le gène iut A était entièrement localisé sur un fragment de restriction Bst E II-Bst E II de 3,2 kb (Tableau VI).

35 Ce fragment a été isolé par électroélution, religué sur lui-même avec la ligase de phage T4 (Boehringer) et digéré avec plusieurs systèmes d'enzymes de restriction. Les

différents fragments ainsi obtenus (taille de 150 à 600 pb) ont été isolés par Geneclean (Bio 101) et sous-clonés dans les vecteurs M13 mp 18 et mp 19 digérés au préalable avec les enzymes appropriées. La séquence de chaque sous-clone 5 a ensuite été déterminée selon la technique de SANGER en utilisant les kits de séquençage Amersham et Sequenase (USB).

Seul le fragment Bst E II-Bst E II 3,2 kb du clone P-13 a été séquencé en totalité. Les deux autres gènes iut A ont 10 été séquencés entre le site Bgl II (1) et le site Eco RV (2396).

La région Bst E II-Bgl II du clone P-13 a été comparée avec la séquence du gène iuc D située juste en amont de iut A (HERRERO et al. (14)) et la région Pvu II-Bst E II 15 de ce clone a été comparée avec la séquence de l'élément IS1 (OHTSUBO et OHTSUBO (25)).

Ces comparaisons ainsi que les comparaisons des séquences des trois gènes iut A avec la séquence du gène iut A de pColV-K30 sont présentées sur la Tableau VII.

20 L'analyse de ces quatre séquences a révélé que le gène iut A était extrêmement conservé au niveau moléculaire. A une ou deux bases près, les trois gènes iut A isolés de souches E. coli d'origine animale sont identiques entre eux. Les différences observées vis-à-vis de la séquence publiée 25 par KRONE et al. (18) sont minimes.

Les trois gènes iut A étudiés ont 99,77 % d'homologie avec le gène iut A de pColV-K30.

Les régions où des différences ont été constatées sont 30 présentées sur le Tableau VIII. (Les chiffres renvoient à la position des bases dans les séquences présentées sur le Tableau VII).

Deux régions importantes sont strictement conservées : la séquence codant pour le peptide signal et la séquence consensus ("Boîte Ton B") typique des récepteurs protéiques 35 de la membrane externe dont la fonction dépend de Ton B.

Il a été mis en évidence, chez chacun des trois gènes

séquencés, l'existence de quatre insertions par rapport au gène iut A de ColV-K30. Ces insertions provoquent des changements limités du cadre de lecture. La structure primaire des protéines Iut A codées par les plasmides isolés 5 des souches utilisées est de ce fait un peu plus grande (+ 8 acides aminés) que celle de la protéine Iut A de p ColV-K30. La séquence des gènes iut A isolés des souches utilisées code pour un polypeptide de 733 acides aminés comprenant un peptide signal de 25 acides aminés identique à celui du 10 polypeptide Iut A de la souche ColV-K30. La masse calculée de la protéine mature est de 78097 daltons, ce qui est légèrement différent de la taille observée sur gel (76 kDa). Les changements dans la structure primaire ne sont cependant pas assez importants pour modifier la structure secondaire 15 et le profil d'hydrophilicité.

2. EXPRESSION DES GENES iut A ET fep A CLONES

- Caractéristiques du vecteur utilisé

Le vecteur d'expression employé est le plasmide GTI 001 construit par le laboratoire de génie génétique de 20 l'Institut Mérieux.

Les gènes qu'il porte et sa carte de restriction sont présentés dans le Tableau IX.

Ce plasmide peut être construit comme suit :

Le plasmide pBRTac, constitué par pBR322 (Bolivar F. 25 et al., Gene 2, 95-113 (1977)) propageant entre HindIII et BamHI le promoteur Tac (Ammann E. et al., Gene 25, 167 (1983)), a son site XhoI détruit par la polymérase de Kleenow (ou "la kleenow") pour donner le plasmide pBRTacX⁻. Ce plasmide est digéré par NcoI, traité par la kleenow, puis 30 digéré par AvAI, et son plus petit fragment est ligué au fragment de pMC9 (Casadaban M.J. et al., Journal of Bacteriology, 143, 971-980 (1980)) digéré par MstII, traité par la kleenow, puis digéré par AvAI portant le gène Lac i et l'origine de réplication de pBR322.

35 Le plasmide résultant (nommé pBRLaciX⁻) est digéré par HindIII, traité par la kleenow puis digéré par PstI, et le fragment de 2350 paires de bases (ou "pb") est ligué au

fragment de 2300 pb de pBRTac digéré par Ec RI, puis traité par la kleenow, puis digéré par PstI, créant ainsi le plasmide pBRTaci. Le fragment de 4406 pb de ce dernier, obtenu par digestion avec EcoRI et PstI est ligué avec un 5 fragment de 1688 pb digéré par EcoRI et PstI dérivé de séquences de pBR322 et portant le gène de résistance à la tétracycline de pBR322.

Le plasmide obtenu est nommé pBRTaciTet. L'origine de réPLICATION de ce dernier est séparée par digestion par 10 BamHI, et le fragment de 2096 pb restant est ligué avec le fragment de 2033 pb de pAT153 (Twigg A.J. & Sherratt, D. Nature, 283, 216-218 (1980)) digéré par XhoI, créant ainsi le plasmide pATTaci0ri.

Ce plasmide est digéré par EcoRI, puis traité à la 15 kleenow, puis digéré par Aval et le fragment de 2704 pb est ligué avec un fragment portant le promoteur Pr et son répresseur thermosensible CI857 du bactériophage Lambda de 3076 pb issu de pCQV2 (Queen c. et al., J. Mol. Appl. Genet. 2, 1-10 (1983)) par digestion par PstI, traitement à la 20 nucléase Mung Bean, et digestion partielle par Aval. Le plasmide résultant est nommé pGTI001.

L'origine de réPLICATION de ce plasmide est sous le contrôle du promoteur tac, ce qui permet de maîtriser le nombre de copies en cultivant les bactéries dans un milieu 25 contenant une concentration plus ou moins grande d'IPTG (Inducteur du gène lac i).

Le gène à exprimer est placé sous le contrôle du promoteur fort "Pr" du phage CI 857 (dont le répresseur est thermosensible). L'ATG du gène à exprimer est remplacé par 30 l'ATG du gène cro. Cet ATG est créé par une digestion partielle Bam HI de p GTI 001, suivie d'une digestion par la Mung Bean nucléase afin d'obtenir une extrémité ATG à bout franc.

Le gène à exprimer est alors inséré en phase (à partir du codon N° 2) entre l'extrémité ATG à bout franc et le site

XhoI. Un signal de terminaison de la transcription, placé juste en aval de ce site XhoI, évite la formation d'ARNs messagers trop longs.

D'autres plasmides de ce genre susceptibles d'exprimer 5 le gène iut A (ou fep A), sont faciles à obtenir ou à construire et l'on connaît de tels plasmides dans lesquels le gène à exprimer est contrôlé par un promoteur dont le represseur est thermosensible.

- Construction du vecteur d'expression du gène iut A

10 Les gènes iut A isolés des souches 15972 et 16003 ont été clonés avec leur séquence signal au niveau du site d'expression Bam HI (899) de p GTI 001.

Pour obtenir une extrémité 5' à bout franc commençant 15 au deuxième acide aminé de la séquence signal (en l'occurrence la méthionine), un oligonucléotide de synthèse double brin a été utilisé pour remplacer la région comprise entre l'ATG d'initiation et le site Acc I unique situé en 5' de la séquence codante. La séquence de cet oligonucléotide est présentée sur le Tableau X.

20 Les deux brins complémentaires de cet oligonucléotide ont été synthétisés et la forme double brin a été obtenue par chauffage à 90°C en tampon NaCl 50 mM, Tris 10 mM, MgCl 10 mM pH 7,5, d'un mélange équimolaire des deux simples brins et refroidissement lent à température ambiante.

25 La stratégie suivie pour insérer le gène iut A de la souche 15972 (clone p P-13) est présentée sur le Tableau XI.

Le rendement n'ayant pas été très satisfaisant, une stratégie modifiée a été adoptée pour la mise en phase du gène iut A de la souche 16003. Cette nouvelle stratégie a 30 fait appel à un sous-clonage de la région Eco RI-Eco RI de la construction intermédiaire (Etape 4, Tableau XII) dans le vecteur pSB 118. Ce vecteur est un dérivé pUC 18. Il possède un "polylinker" encadré par deux sites Eco RI. Le sous-clonage du fragment Eco RI-Eco RI dans ce vecteur a 35 donc permis de réaliser la mise en phase du gène iut A en évitant les digestions partielles (Tableau XII).

Les cartes de restriction des plasmides d'expression GTI P-2 (gène iut A de la souche 15972) et GTI B-5 (gène iut A de la souche 16003) ainsi obtenus sont présentées sur le Tableau XIII.

5 Les clones obtenus après nouvelle ligation avec l'oligonucléotide "iut" double brin ont été sélectionnés sur la base de la conservation du site Acc I du gène iut A et de la disparition du site Bam HI de p GTI 001. Tous les clones présentant ce profil de restriction ont été ensuite 10 contrôlés au niveau de l'expression de la protéine Iut A.

- Contrôle de l'expression d'Iut A

Contrôle qualitatif

Les clones sélectionnés ont été cultivés en milieu M9 SP tétracycline en présence d'IPTG 0,4 mM à 32°C (début 15 d'induction). La sensibilité de ces clones vis-à-vis de la cloacine a été recherchée par la technique décrite précédemment.

2 clones sur 25 ont été positifs pour les constructions GTI-iut 15972

20 3 clones sur 6 ont été positifs pour les constructions GTI-iut 16003

Les clones sensibles à la cloacine sont cultivés dans 50 ml de milieu M9 SP tétracycline contenant de l'IPTG 0,4 mM.

25 La culture est faite à la température de 30°C jusqu'à ce que la densité optique atteigne la valeur de 1. L'induction de l'expression du gène iut A est alors réalisée en continuant la culture pendant 4 heures à + 42°C. Les bactéries sont centrifugées et leurs protéines totales sont 30 analysées par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Ceci permet d'apprécier directement l'importance de la production de la protéine Iut A (figure 1). L'analyse des protéines du clone CMK 603 GTI P-2 a révélé que la protéine Iut A et son précurseur représentaient, après induction, 25 % des protéines totales de la bactérie. La protéine Iut A seule représente 30 % des protéines de la membrane 35

externe.

- Construction du vecteur d'expression du gène fep A

Caractéristiques du clone initial p MS 101

Suivant les résultats de CODERRE et EARHART (6) qui
5 indiquaient que le gène fep A était situé sur un fragment
Bam HI-Bam HI de 6,3 kb du plasmide pMS 101 construit par
LAIRD et YOUNG (19), ce fragment a été sous-cloné dans le
vecteur pBR 322 digéré par Bam HI. La carte de restriction
du plasmide obtenu (F-1) s'est révélée semblable à celle du
10 plasmide pITS 1 (FLEMING et al. (11)) (Tableau XIV).

La publication de la séquence de fep A (LUNDIGAN et
KADNER) (22) a permis de situer précisément ce gène sur le
fragment de restriction Ssp I-Stu I 2530 pb du plasmide F-1.

La stratégie suivante a été utilisée pour insérer le
15 gène fep A dans p GTI 001.

Une mutagénèse dirigée a été réalisée en région 5' terminale de la région codante pour transformer la séquence :

5' ATGAACAAG 3'

en un site de restriction Hpa I

20 MET ASN LYS

-

G T T A A C A A G

Ce site est coupé en bouts francs de la façon suivante
GTT AA C. Cela permet une ligation directe du gène fep A
25 avec l'extrémité ATG créée dans p GTI 001.

La mutagénèse a été effectuée selon la technique
d'ECKSTEIN à partir d'un oligonucléotide (Tableau XV), après
sous-clonage du fragment Ssp I-Eco RI 800 pb dans la forme
réplicative du phage M13 mp 19.

30 Le fragment muté a été entièrement séquencé pour
vérifier que la séquence n'avait pas été modifiée ailleurs
qu'au site visé.

Les modalités d'intégration du gène fep A sont résumées
sur les Tableaux XVI et XVII.

35 Les différents clones obtenus après ligation du frag-
ment HpaI-XhoI 2350 pb dans le plasmide GTI 001 ont été

FEUILLE DE REMPLACEMENT

sélectionnés sur la présence d'un fragment Eco RI- Eco RI de 1700 pb.

- Contrôle de l'expression de Fep A

Contrôle qualitatif

5 Le mélange de ligation entre le fragment Hpa I- Xho I 2350 pb et le plasmide GTI 001 a servi à transformer des bactéries compétentes RWB 18. Cette souche étant fep A, elle est résistante à la colicine B.

10 Les clones ayant la carte de restriction recherchée (Tableau XVII) ont été testés sur leur sensibilité à la colicine B.

Un clone (RWB 18 GTI F-12) s'est révélé sensible à l'action de la colicine B.

Contrôle quantitatif

15 L'expression de la protéine Fep A et de son précurseur a été analysée sur gel de polyacrylamide-SDS (figure 2). Le clone CMK 603 GTI F-12 exprime Fep A et son précurseur en très grosse quantité (20 % des protéines totales).

La protéine Fep A représente 32 % des protéines de la 20 membrane externe.

- Etude physiologique et morphologique des clones exprimant Iut A et Fep A

Aptitude à la culture

25 L'aptitude à la culture des clones obtenus a été testée à différentes températures de culture en milieu LB tétracycline IPTG.

Ensemencés en nappe sur gélose LB tétracycline IPTG 0,1 mM, tous les clones forment des tapis bactériens sensibles aux bactériocines lorsqu'on les cultive à des 30 températures comprises entre 30°C et 34°C.

Au-delà de 34°C, les tapis bactériens ne se forment plus. Ce phénomène a également été observé en milieu LB liquide.

35 La sensibilité aux bactériocines est retrouvée pour des concentrations en IPTG aussi basses que 0,05 mM et à la température de 30°C. Il existe donc un certain niveau

d'expression des gènes iut A et fep A, en l'absence d'induction du vecteur p GTI 001.

Etude morphologique

Les différents clones subissent des modifications morphologiques consécutives à la surexpression d'Iut A et de Fep A.

Les bactéries, observées au microscope optique à contraste de phase après induction à + 42°C pendant 4 heures, présentent un allongement important (jusqu'à dix fois la longueur moyenne d'une Escherichia coli K12 normale). Cependant, la caractéristique la plus frappante est la présence d'une à plusieurs inclusions intracytoplasmiques à l'intérieur de chaque corps bactérien.

Les inclusions observées au microscope optique sont retrouvées lors de l'observation au microscope électronique après coloration négative de coupes de bactéries cultivées à + 42°C pendant 4 heures.

Ces inclusions sont périphériques et adjacentes à la face interne de la membrane cytoplasmique.

20 3. PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES DES PROTEINES Iut A ET Fep A
- Immunogénicité de Iut A et de Fep A

Les protéines Iut A, extraites des membranes externes des souches E. coli 15022, 15393, 16003 et de la souche recombinante Escherichia coli CMK 603 GTI P-2, ont été isolées par gels de polyacrylamide préparatifs et injectées à des lapins selon le protocole décrit précédemment.

L'évolution du titre des anticorps anti-Iut A produits par chaque lapin a été évaluée par la technique ELISA en prenant comme antigène une solution de "granules" (protéine proIut A précipitée) extraits d'une culture de la souche E. coli CMK 603 GTI P-2.

Le sérum positif de référence utilisé est un sérum de lapin anti-protéine Iut A d'E. coli ColV-K30 qui a été fourni par B. OUDEGA.

35 Le même protocole a été suivi pour les protéines Fep A extraites des membranes des souches E. coli 15022 et E. coli

RWB 18 GTI F12.

Dans tous les cas, les lapins ont réagi à l'injection des protéines Iut A et Fep A en produisant un titre élevé d'anticorps spécifiquement dirigés contre ces protéines.

5 - Propriétés antigéniques des protéines Iut A et Fep A

La spécificité des différents anticorps obtenus a été étudiée vis-à-vis de plusieurs préparations de membranes externes (souches *E. coli* 15022, 15393, CMK 603 GTI P-2, CMK 603 GTI B-5 et RWB 18 GTI F-12). Cette étude a été réalisée 10 par la technique du "Western blot".

Les quatre sérums anti-Iut A produits, de même que le sérum anti-Iut A colV-K30 de référence, reconnaissent spécifiquement une protéine de 76 kDa dans toutes les préparations de membranes externes des souches exprimant le 15 système aérobactine. Quelle que soit la protéine Iut A (sauvage ou recombinante) ayant servi à leur induction, les anticorps d'un même sérum reconnaissent spécifiquement la protéine Iut A exprimée par les souches *E. coli* d'origine aviaire et bovine et les deux protéines Iut A produites par 20 les souches recombinantes *E. coli* CMK 603 GTI P-2 et CMK 603 GTI B-5.

Le précurseur de la protéine Iut A, la protéine proIut A est, elle aussi, reconnue spécifiquement par tous les sérums anti-Iut A. (Immunoblots réalisés avec les 25 "granules" purifiés produits par les souches CMK 603 GTI P-2 et CMK 603 GTI B-5).

La protéine Fep A n'est pas reconnue par les sérums anti-Iut A et, inversement, les sérums anti-Fep A ne reconnaissent pas les protéines Iut A.

30 Le clonage des gènes iut A et fep A dans le vecteur d'expression GTI 001 permet de produire en grande quantité les protéines Iut A et Fep A ainsi que leurs précurseurs respectifs. Les protéines Iut A ou Fep A et leurs précurseurs synthétisés à la suite de l'induction de la 35 transcription par culture des bactéries à 42°C, s'accumulent rapidement sous forme d'inclusions cytoplasmiques (granules)

FEUILLE DE REMPLACEMENT

de grande taille, visibles au microscope optique à contraste de phase. L'observation au microscope électronique de coupes de bactéries induites révèle que ces granules sont étroitement accolés à la face interne de la membrane cytoplasmique.

Il faut noter l'importance du niveau d'expression des précurseurs d'Iut A et de Fep A (25 % des protéines totales en moyenne dans des conditions non optimisées). Les protéines matures représentent jusqu'à 35 % du contenu protéique de la membrane externe. On peut considérer ce pourcentage comme la limite supérieure de l'intégration de ce type de protéine dans la membrane externe. A titre de comparaison, les protéines Iut A et Fep A exprimées par la souche sauvage Escherichia coli 15022 représentent ensemble 30 % des protéines de la membrane externe. Il apparaît donc que l'expression totale des protéines Iut A et Fep A, et de leurs précurseurs, par les souches recombinantes conformes à l'invention est très supérieure à l'expression naturelle.

La mise en évidence d'une sensibilité à la cloacine DF 13 chez les clones exprimant la protéines Iut A, et d'une sensibilité à la colicine B chez ceux qui expriment la protéine Fep A démontre que la synthèse et l'intégration de ces protéines dans la membrane externe se déroulent normalement.

L'identité des protéines obtenues par recombinaison génétique avec les protéines sauvages est également démontrée par la reconnaissance de ces protéines par des anticorps dirigés contre les protéines Iut A et Fep A naturelles. On notera que ces anticorps reconnaissent aussi, avec la même spécificité, les précurseurs proIut A et proFep A précipités dans les inclusions intracytoplasmiques.

Les anticorps induits par les protéines Iut A et Fep A obtenues par recombinaison génétique reconnaissent, de la même façon, spécifiquement les protéines Iut A et Fep A exprimées par différentes souches d'Escherichia coli pathogènes.

La surexpression des récepteurs Iut A et Fep A par clonage de leurs gènes sur un vecteur d'expression, permet d'obtenir, dans un milieu riche en fer, des protéines de membrane externe fonctionnellement et antigéniquement identiques aux protéines exprimées par les bactéries pathogènes au cours de leur multiplication *in vivo*.

La synthèse des protéines Iut A et Fep A par recombinaison génétique présente donc de nombreux avantages :

- elle permet d'obtenir les protéines Iut A et Fep A en très grande quantité, tout en s'affranchissant de la régulation par le fer,

- les protéines synthétisées sont fonctionnellement et antigéniquement identiques aux protéines exprimées par les bactéries pathogènes au cours de leur multiplication *in vivo* et induisent la formation d'anticorps,

- utilisées, à titre de principe actif, dans un vaccin, elles induisent la formation d'anticorps qui empêchent la reconnaissance spécifique, par les protéines de membrane régulées par le fer, des sidérophores, arrêtant par là même l'alimentation en fer et bloquant leur multiplication chez l'hôte ; elles permettent donc, à ce titre, la préparation de vaccins très utiles pour prévenir ou lutter contre les infections y compris septicémies.

Les vaccins peuvent aussi être préparés simplement à partir des clones recombinants inactivés ou à partir de fragments de membrane obtenus par lyse des clones recombinants suivi d'une purification, selon les techniques usuelles pour la fabrication de vaccins à base d'antigènes de surface ou de paroi.

IV. PREPARATION D'IROMPS PAR CULTURE EN MILIEU RESTREINT EN FER.

1) Souche : *E. coli* 078 référence 15022 :

Origine poulet

5 2) Culture :

- Milieu :

Milieu ST + succinate (Simon E. H. et Tesmann (1963) Proc. Natl. Acad. Sci USA 50, 526-532)

. additionné de lactoferrine (250 µg/ml)

10 pour obtenir un milieu carencé en fer,

. ou additionné de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (40 µM) : pour un milieu riche en fer.

- Culture :

- 3 passages de la souche en milieu riche en fer suivis d'un passage d'adaptation en milieu carencé avant culture finale en milieu carencé

- parallèlement on effectue une culture de la même souche en milieu riche en fer,

- les cultures sont menées à 37°C pendant 24 20 heures.

3) Analyse :

En fin de culture, dans chaque milieu, on procède aux opérations suivantes :

- Récolte par centrifugation,

25 - Récolte du culot en Tris HCl 0,2 M pH 8 et ultrasonication,

- Centrifugation (5000 g 30 minutes),

- Surnageant recentrifugé (100 000 g, 1 heure),

- Reprise du culot en Tris HCl (50 mM, pH 8), $MgCl_2$ (10 mM),

30 EDTA 1 mM, Triton x 100 (2 %) et agitation 20 minutes à 37°C,

- Centrifugation 1 heure à 100 000 g puis réextraction du culot,

- Lavage du culot en eau déminéralisée,

35 - Analyse du culot en gel de polyacrylamide (PAGE SDS) en conditions dénaturantes (mercaptopéthanol, SDS).

4) Résultat :

- Membranes des bactéries cultivées en présence de lactoferrine : présence de deux protéines, en quantité importante, de poids moléculaire apparent 80000 da (récepteur de l'entérobactine, Fep A) et 76000 da (récepteur de l'aérobactine, Iut A),
- 5 - Membranes des bactéries cultivées en milieu riche en fer : absence de bande de 76000 et 80000 da.

V - PREPARATION DE VACCINS.

10 De préférence, les principes actifs selon l'invention seront associés, dans les vaccins, à des préparations antigéniques classiques dans les vaccins anti-bactériens humains ou vétérinaires connus, et ceci notamment, dans le cas où l'on utilise les protéines purifiées.

15 Ces vaccins peuvent présenter les principes actifs selon l'invention dans des véhicules liquides usuels pour l'administration par voie parentérale. Ils peuvent comprendre des adjuvants classiques, par exemple huileux.

TABLEAU I

| <u>Souches pathogènes</u> | <u>Sérotype</u> | <u>Animal d'Origine</u> | <u>Référence</u> |
|--|---|------------------------------|-------------------------------|
| <u>E. coli</u> 15 022 | O 78 | Poulet | Souchothèque RM |
| " 15 393 | O 86 | Veau | " |
| " 15 972 | O 2 | Poulet | " |
| " 16 000 | O 138 | Veau | " |
| " 16 003 | O 138 | Veau | " |
| <u>E. coli</u> KM 576 | (p ColV-K30) | Homme | B. OUDEGA |
| <u>Souches hôtes E. coli K12</u> | <u>génotype</u> | <u>origine ou référence</u> | |
| . C 600 | F- <u>thr</u> , <u>thi</u> , <u>leu</u> , <u>lac Y</u> , <u>fhu A</u> , <u>sup E</u> | | (MANIATIS et al.) |
| . HB 101 | F- <u>hsd</u> (r ⁻ s, m ⁻ s), <u>recA</u> , <u>ara</u> , <u>pro</u> , <u>lacY</u> , <u>gal</u> , <u>rps</u> , <u>xyl</u> , <u>mtl</u> , <u>supE</u> | | (MANIATIS et al.) |
| . RWB 18 | F- <u>thi</u> , <u>proG</u> , <u>leu</u> , <u>trp</u> , <u>entA</u> , <u>fepA</u> | | (HOLLIFIELD et NEILANDS (14)) |
| . CMK 603 | F+ <u>thr</u> , <u>thi</u> , <u>leu</u> , <u>supE</u> , <u>rec BC</u> , <u>fhu A</u> , <u>lac Y</u> , r ⁻ s, m ⁺ | | Institut Mérieux |
| . 15525 | F- | | Souchothèque RM |
| <u>Souches productrices de bactériocines</u> | | | |
| . <u>E. coli</u> 1300 | | Productrice de colicine B | R. PORTALIER |
| . <u>Enterobacter cloacae</u> DF 13 S458 | | Productrice de cloacine DF13 | B. OUDEGA |

FEUILLE DE REMPLACEMENT

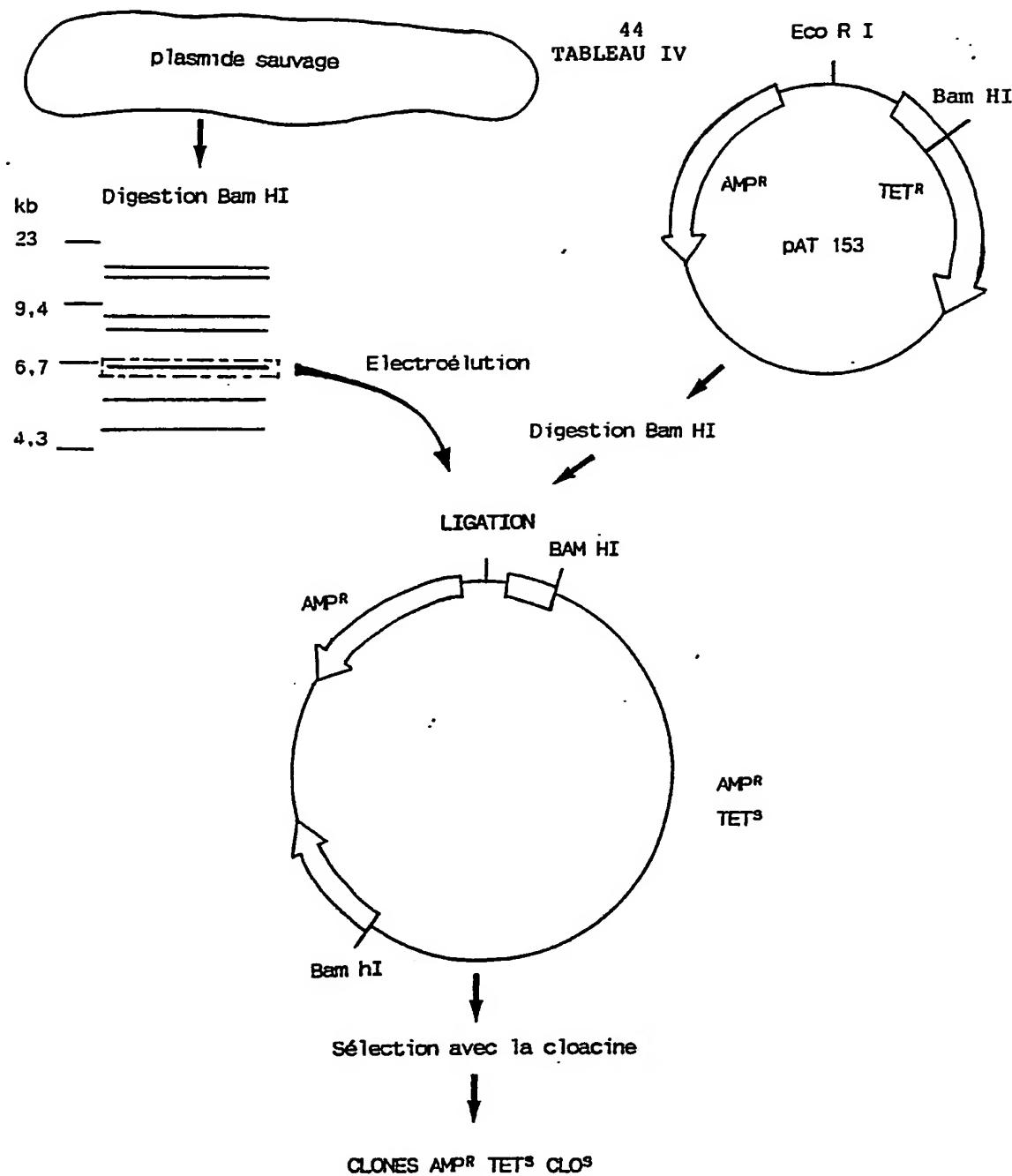
2
TABLEAU II

| Nom | Taille (paires de bases) | Caractéristiques | Référence ou origine |
|----------|-----------------------------|---|--|
| pBR 322 | 4363 | Amp ^r Tet ^r Vecteur de clonage | F. BOLIVAR |
| pAT 153 | 3600 | Amp ^r Tet ^r Vecteur de clonage | A. TWIGG |
| pSB 118 | 2692 | Amp ^r Dérivé de pUC18 Vecteur de clonage | P. STRAGIER I ^t .Pasteur Paris |
| pGTI 001 | 5780 | Tet ^r Vecteur d'expression | P. BRUNEAU I ^t Mérieux |
| pABN 1 | 18300 | Amp ^r Vecteur p Plac + fragment Hind III 16,3 kb de ColV-X30 portant l'opéron aérobactine | BINEREIF et NEILANDS (2) |
| pMS 101 | 15300 | Amp ^r Vecteur pBR 322 + fragment Hind III de 11 kb du chromosome de <u>E. coli</u> portant les gènes <u>entD</u> , <u>fepA</u> , <u>fes</u> et <u>entF</u> | LAIRD et YOUNG (19) |

FEUILLE DE REMplacement

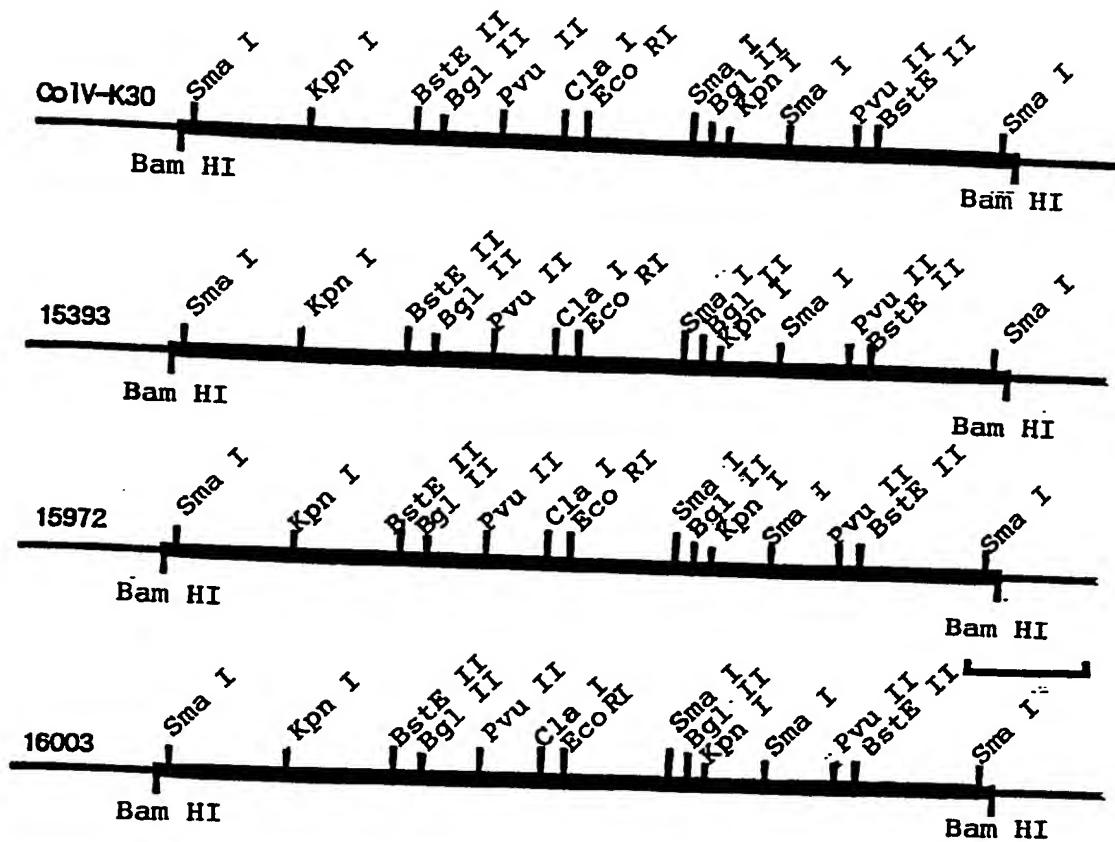
TABLEAU III

| Jour 0 | Jour 14 | Jour 28 | Jour 35 |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| injection intradermique | injection intramusculaire | injection intramusculaire | injection intramusculaire |
| 125µg | 125µg | 125µg | 250µg |
| Prise de sang 5 ml | | Prise de sang 10 ml | |
| Jour 42 | Jour 49 | Jour 56 | |
| injection intramusculaire | injection intramusculaire | | |
| 250µg | 250µg | | |
| Prise de sang 50 ml | | Prise de sang 60 ml | |

STRATEGIE DE CLONAGE DES GENES jut A

FEUILLE DE REMPLACEMENT

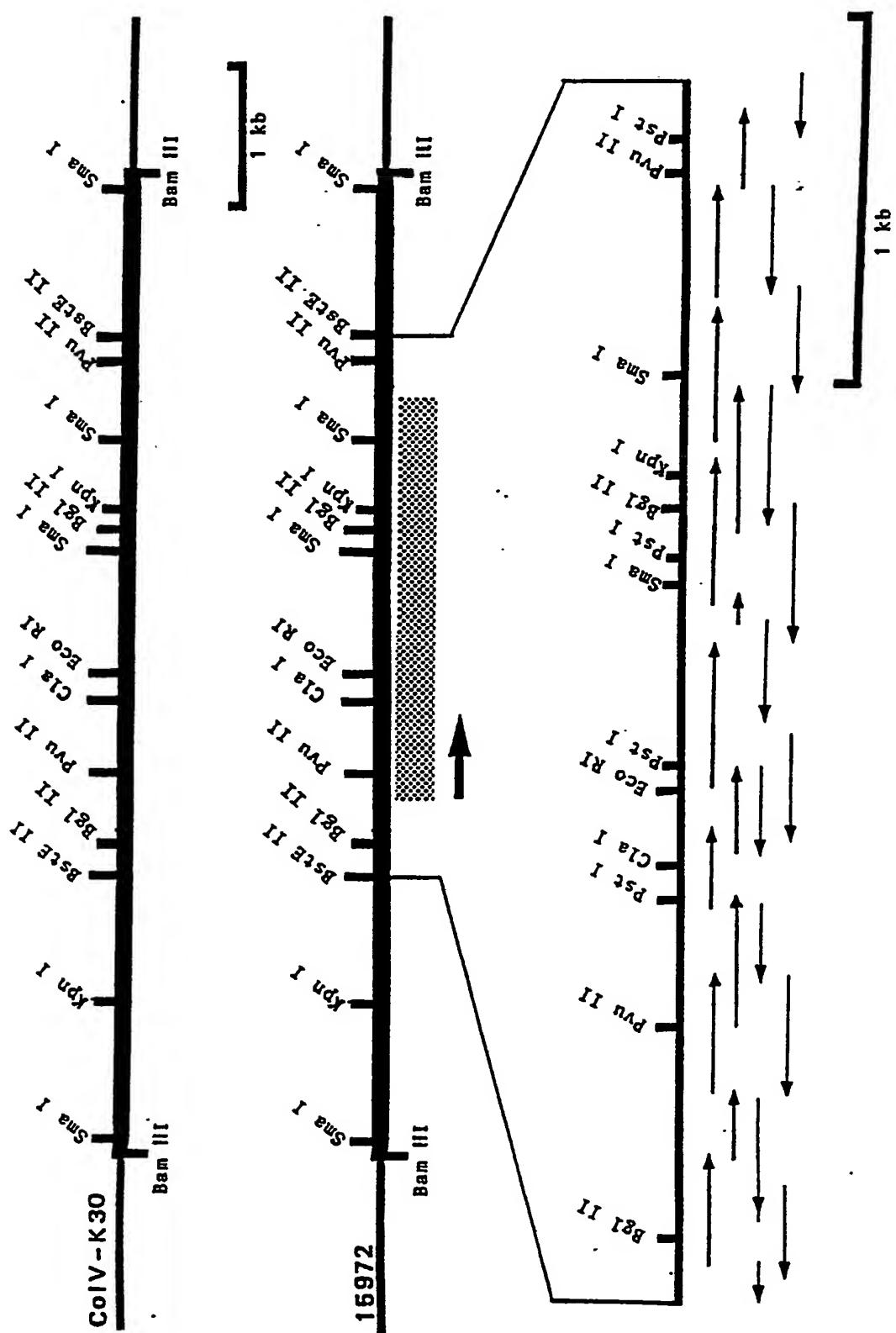
TABLEAU V



CARTE DE

RESTRICTION DES FRAGMENTS Bam HI - Bam HI PORTANT LE GENE jut A
 ISOLES DES SOUCHES CoIV-K30, 15393, 15972 ET 16003

46



STRATEGIE DE SEQUENCAGE DU GENE β lut. A

47
TABLEAU VII

Comparaison des séquences nucléotidiques des fragments de restriction BstE II - BstE II (3,2 kpb) des opérons aérobactine de p ColV-K30 et p 15972

| | |
|----------|--|
| ColV-K30 | GGTTACCGTTCTCGCTTGCACAAATACTTCCCTCACTGATGCCCTGATCACCATGCAC |
| 15972 | GGTTACCGTTCTCGCTTGCACAAATACTTCCCTCACTGATGCCCTGATCACCATGCAC |
| 61 | GATAAGAACACCTTAAAGTGCCTGATGACTTCACCTCTGGAAATGGAGTGGCCGAAAGAG |
| 61 | GATAAGAACACCTTAAAGTGCCTGATGACTTCACCTCTGGAAATGGAGTGGCCGAAAGAG |
| 121 | AACAACATCTCGTGGTCAACGCCAGTATGCAAAACCCATGGCATGCCGAACCCAGCTC |
| 121 | AACAACATCTCGTGGTCAACGCCAGTATGCAAAACCCATGGCATGCCGAACCCAGCTC |
| 181 | AGCCTGATGGCATGGAGATCTGCACGTATTCTTAATCGCTAATGGGACGTGATTIATT |
| 181 | AGCCTGATGGCATGGAGATCTGCACGTATTCTTAATCGCTAATGGGACGTGATTIATT |
| 241 | GATCTCAGTATGCCGCCGCCCTGATTCACTGGCGCAGGCACCTAGGGAAAACGCAGCCG |
| 241 | GATCTCAGTATGCCGCCGCCCTGATTCACTGGCGCAGGCACCTAGGGAAAACGCAGCCG |
| | <i>Fin 1re B</i> |
| 301 | GACTTGTCTTAACCTCGCTACACAGCATTTGGGCTGATTTTCCGCCGTATGGAGG |
| 301 | GACTTGTCTTAACCTCGCTACACAGCATTTGGGCTGATTTTCCGCCGTATGGAGG |
| 361 | AATAATGATGATAAGCAAAAGTATACGCTTGGGCTCTCAACCCACTGCTTCTTACCAT |
| 361 | AATAATGATGATAAGCAAAAGTATACGCTTGGGCTCTCAACCCACTGCTTCTTACCAT |
| 421 | GATGGCGCCAGTCGCTCAACAAACCGATGATGAAACGTTCTGGGTCTGCCAACCG |
| 421 | GATGGCGCCAGTCGCTCAACAAACCGATGATGAAACGTTCTGGGTCTGCCAACCG |
| 481 | CAGCAATCGACCGTAGCGGAGATGGCGAAACCCACCTGGTTATGAAAAACGCCGAAC |
| 481 | CAGCAATCGACCGTAGCGGAGATGGCGAAACCCACCTGGTTATGAAAAACGCCGAAC |
| 541 | GGAACAGCAGATTAGGGCGGAAAGAGCTTAAAGACGCACTGGCTAGCTGATCCCTGG |
| 541 | GGAACAGCAGATTAGGGCGGAAAGAGCTTAAAGACGCACTGGCTAGCTGATCCCTGG |
| 601 | CCTTGACGTCAAGCAGCCGGAGCCGACCAAACCTACGGTATGAAATGTGCCTGGCCGCCGCT |
| 601 | CCTTGACGTCAAGCAGCCGGAGCCGACCAAACCTACGGTATGAAATGTGCCTGGCCGCCGCT |
| 661 | GGTCGTGCTGGTTGACGGCGTGCCTCAACTCTTACGTACCGACAGCCGACAACTGG |
| 661 | GGTCGTGCTGGTTGACGGCGTGCCTCAACTCTTACGTACCGACAGCCGACAACTGG |
| 721 | CTCTATAGATCCTTTAATATGCAACCATATTGAAGTGTCTCGGTGCGACGTCCCTGTA |
| 721 | CTCTATAGATCCTTTAATATGCAACCATATTGAAGTGTCTCGGTGCGACGTCCCTGTA |
| 781 | CGGCAGGCGGCACTACCGGTGGCCTGATCAACATCGTGACCAAAAGGCCAGCCGGAAAC |
| 781 | CGGCAGGCGGCACTACCGGTGGCCTGATCAACATCGTGACCAAAAGGCCAGCCGGAAAC |
| 841 | CATGATGGAGTTGAGGCTGGCACCAAAAGTGGCTTAGCAGCAGTAAAGATCACGATGA |
| 841 | CATGATGGAGTTGAGGCTGGCACCAAAAGTGGCTTAGCAGCAGTAAAGATCACGATGA |

TABLEAU VII (suite)

901 ACGCATTGCCGGAGCTGTCTCCGGCGAAATGAGCATATCTCCGGACGTCTTCCGTGGC
 901 :::
 961 ATATCAGAAATTGGCGGCTGGTTACGGTAACGGCGATGCCACCTTGCTTGATAACAC
 961 :::
 1021 CCAGACCGGGCCTGCAGTACTCCGATCGGCTGGACATCATGGGAACCTGGTACGCTGAACAT
 1021 :::
 1081 CGATGAATCCCGGAGCTTCAGTTGATCACACAGTACTATAAAAGCCAGGGCGACGACGA
 1081 :::
 1141 TTACGGGCTTAATCTCGGGAAAGGCTTCTGCCATCAGAGGGACCAGCACGCCATTG
 1141 :::
 1201 CAGTAACGGGCTGAATTCCGACCGTATTCCCGGCACTGAGCGGCATTGATCAGCCTGCA
 1201 :::
 1261 GTACTCTGACAGCGCTTTCTGGGACAGGAGCTGGTCGGTCAGGTTACTACCGCGATGA
 1261 :::
 1321 GTCGTTGCGATTCTACCCGTTCCGACGGTAAATGCGAACAAACAGGTGACGGCTTCTC
 1321 :::
 1381 TTTCGTCACAGCAGGACACCGACCCAGTACGGCATGAAACTGACTCTGAACAGCAAACCGAT
 1381 :::
 1441 GGACGGCTGGCAAATCACCTGGGGGCTGGATGCTGATCATGAGCGCTTACCTCCAACCA
 1441 :::
 1501 GATGTTCTCGACCTGGCTCAGGCAAGCGCTTCCGGAGGGCTGAACAACAAGAAGATTTA
 1501 :::
 1561 CACCAACGGGCGCTATCCGTCGTATGACATCACCAACCTGGCGGCCTTCTGCAATCAGG
 1561 :::
 1621 CTATGACATCAATAATCTTTACCCCTAACGGTGGCGTACGCTATCAGTACACTGAAAA
 1621 :::
 1681 CAAGATTGATGATTTCATCGGCTACGGCAGCAACGGCAGATTGGCGCCGGGAAGGGCTAC
 1681 :::
 1741 ATCCGCCGACG CATT CTGGCGGCTCAGTCGATTACGAC ACTTCCGTGTTAACGCCGG
 1741 :::
 1741 ATCCGCCGACGCCATTCCCTGGCGGCTCAGTCGATTACGACAACCTCCGTGTTAACGCCGG

TABLEAU VII (suite)

| | |
|------|---|
| 1798 | TCTGCTGATGCACATCACCGAACCGCAGCAGGCATGGCTCAACTTCTCCAGGGCGTGG ::: |
| 1801 | TCTGCTGATGCACATCACCGAACGCCAGCAGGCAGGCATGGCTCAACTTCTCCAGGGCGTGG ::: |
| 1858 | GCTGCCGGACCCGGGTAATAACTATGGTCGCGGCATCTATGGTGCTGCAGTGAAACGGCCA ::: |
| 1861 | GCTGCCGGACCCGGGTAATAACTATGGTCGCGGCATCTATGGTGCTGCAGTGAAACGGCCA ::: |
| 1918 | TCTCCTCTAACAAAGAGTGTGAACGTCAGCGACAGCAAGCTGGAAGGCCTGAAAGTCGA ::: |
| 1921 | TCTCCTCTAACAAAGAGTGTGAACGTCAGCGACAGCAAGCTGGAAGGCCTGAAAGTCGA ::: |
| 1978 | TTCTTATGAGCTGGCTGGCGCTTACTGGCAATAATCTGCGTACCCAAATCGCGGCC ::: |
| 1981 | TTCTTATGAGCTGGCTGGCGCTTACTGGCAATAATCTGCGTACCCAAATCGCGGCC ::: |
| 2038 | CTATTGATTTCTGATAAGAGCGTGGTGGCGAATAAAAGATCTGACCATCAGCGTGGTGG ::: |
| 2041 | CTATTGATTTCTGATAAGAGCGTGGTGGCGAATAAAAGATCTGACCATCAGCGTGGTGG ::: |
| 2098 | CGACAAACGCCGTATTTACGGCGTGGAAAGGTGCCTGGACTACCTGATTCTGATACTGA ::: |
| 2101 | CGACAAACGCCGTATTTACGGCGTGGAAAGGTGCCTGGACTACCTGATTCTGATACTGA ::: |
| 2158 | CTGGAGTACCGGAGTGAACCTAACGTGCTGAAAAGTGAAGTCGAAAGTGAACGGTACCTG ::: |
| 2161 | CTGGAGTACCGGAGTGAACCTAACGTGCTGAAAAGTGAAGTCGAAAGTGAACGGTACCTG ::: |
| 2218 | GCAGAAAATACGATGTGAAGACAGCAAGCCCCTACAAAAGCGACAGCCTACATTGGCTGG ::: |
| 2221 | GCAGAAAATACGATGTGAAGACAGCAAGCCCCTACAAAAGCGACAGCCTACATTGGCTGG ::: |
| 2278 | ACCGGACCCGTGGAGTCTGCGCGTGCAAGACACCACCTCCTTGACGTGAGCGACGCG ::: |
| 2281 | ACCGGACCCGTGGAGTCTGCGCGTGCAAGACACCACCTCCTTGACGTGAGCGACGCG ::: |
| 2338 | GGGCTACAAGGTGATGGCTATACCACCGTGGACTCTGCTCGCAGTTATCAGCTTCCGG ::: |
| 2341 | GGGCTACAAGGTGATGGCTATACCACCGTGGACTCTGCTCGCAGTTATCAGCTTCCGG ::: |
| 2398 | GGGTACACTCAGCTTCAGCATTGAAAACCTCTCGACCGTGACTACACCAACTGTCTGGGG ::: |
| 2401 | GGGTACACTCAGCTTCAGCATTGAAAACCTTTGACCGTGACTACACCAACTGTCTGGGG ::: |
| 2458 | GCAGCGTGCACCACTGTACTACAGCCGGGTTACGGCCCAGCGTCACTGTACGACTACAA ::: |
| 2461 | GCAGCGTGCACCACTGTACTACAGCCGGGTTACGGCCCAGCGTCACTGTACGACTACAA ::: |
| 2518 | AGGCAGGGGCC CACCTTGGCTGAAACTACTCTGTGCTGTTCTGACCGGTATTCTTTA ::: |
| 2521 | AGGCAGGGGCCAACCTTGGCTGAAACTACTCTGTGCTGTTCTGACCGGTATTCTTTA ::: |
| 2577 | CAACAAAGGTACGCTGATATCAACATGGCCGCTGACAGCCAAGTTGATATCATATAATAC ::: |
| 2581 | CAACAAAGGTACGCTGATATCAACATGGCCGCTGACAGCCAAGTTGATATCATATAATAC ::: |
| 2637 | ACGACATAATCTGTAGTCAGGGAGGATAGACTCTTACTGACTACAGATTATGTCCTGTT ::: |
| 2641 | ACGACATAATCTGTAGTCAGGGAGGATAGACTCTTACTGACTACAGATTATGTCGTGTT ::: |

TABLEAU VII (suite)

2697 CCGTGCTCATTCCTCAAAAAAAATACAAGAAAAGAATTAGTATTCTAACAAAAGTGAAA
2701 CCGTGCTCATTCCTCAAAAAAAATACAAGAAAAGAATTAGTATTCTAACAAAAGTGAAA
2757 TAAATTGTATCAAACCTCCCTTTAATCCTGTTGAGTAATCAGCTTTGCAATAGGAT
2761 TAAATTGTATCAAACCTCCCTTTAATCCTGTTGAGTAATCAGCTTTGCAATAGGAT
2817 TGAAAGAGTGTAAAGTGGAACTCTTCCGGATACTCGTTACCAACCGTGGCTAGAATATCTA
2821 TGAAAGAGTGTAAAGTGGAACTCTTCCGGATACTCGTTACCAACCGTGGCTAGAATATCTA
2877 CGGCTGCGGGGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTGTTGAGGTC
2881 CGGCTGCGGGGGGTGATGCTGCCAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTGTTGAGGTC
2937 CTCCAGTGGCTTCTGTTCTATCAGCTGTCCTCCTGTCAGCTACTGACGGGGTGGTGC
2941 CTCCAGTGGCTTCTGTTCTATCAGCTGTCCTCCTGTCAGCTACTGACGGGGTGGTGC
2997 GTAAACGGCAAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTATCTCTGCTCTCACTGCCGTAAAACAT
3001 GTAAACGGCAAAAGCACCGCCGGACATCAGCGCTATCTCTGCTCTCACTGCCGTAAAACAT
3057 GGCAACTGCAGTTCACTTACACCGCTTCTCAACCCGGTACGCACCAAGAAAATCATTGATA
3061 GGCAACTGCAGTTCACTTACACCGCTTCTCAACCCGGTACGCACCAAGAAAATCATTGATA
3117 TGGCCATGAATGGCGTTGGATGCCGGCAACCGCCCCGCATTATGGGCCTTGGCCTCAACA
3121 TGGCCATGAATGGCGTTGGATGCCGGTACGTCCCCGCATTATGGGCCTTGGCCTCAACA
3177 CGATTTCCGCCATTAAAAAAACTCAGGCCGCGAGTCGGTAACC
3181 CGATTTACGTCACTAAAAAAACTCAGGCCCGAGTCGGTAACC

Matches = 3207 Mismatches = 12 Unmatched = 4
Length = 3223 Matches/length = 99.5 percent

51
755 TABLEAU VIII

Co1V-K30 GTG ATC TTC GGT GCG

15393 _____

15972 _____C_____

16003 _____

1748

Co1V-K30 GAC GCA TTC TGG CGG CTC AGT CGA TTA CGA CAC TTC CTG

15393 _____C ATT CCT GGC GGC TCA GTC GAT TAC GAC AAC TTC CTG

15972 _____C ATT CCT GGC GGC TCA GTC GAT TAC GAC AAC TTC CTG

16003 _____C ATT CCT GGC GGC TCA GTC GAT TAC GAC AAC TTC CTG

1814

Co1V-K30 ACC GAA CCG CAG CAG

15393 _____GC_____

15972 _____GC_____

16003 _____GC_____

2421

Co1V-K30 GAA AAC CTC TTC GAC

15393 _____T_____

15972 _____T_____

16003 _____

2525

Co1V-K30 GGC CCA CCT TTG GTC TGA

Gly Pro Pro Leu Val END

15393 GGC CGA ACC TTT GGT CTG AAC TAC TCT GTG CTG TTC TGA

15972 _____GA ACC TTT GGT CTG AAC TAC TCT GTG CTG TTC TGA

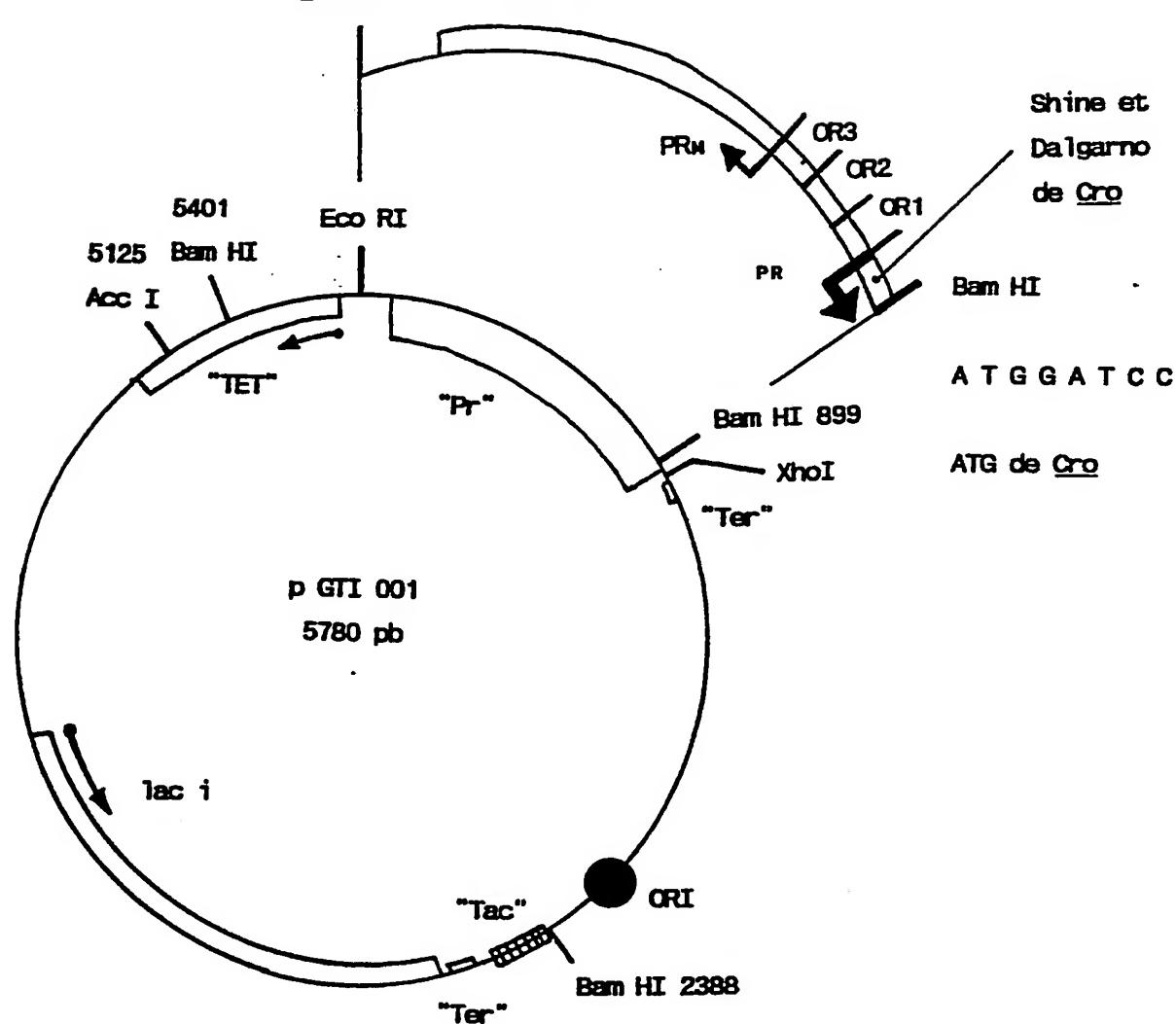
16003 _____GA ACC TTT GGT CTG AAC TAC TCT GTG CTG TTC TGA

Gly Arg Thr Phe Gly Leu Asn Tyr Ser Val Leu Phe END

DIFFÉRENCES ENTRE LES SÉQUENCES DES 3 GENES iut A CLONES
ET LA SÉQUENCE DU GENE iut A DE p Co1V-K30

FEUILLE DE REMPLACEMENT

52
 TABLEAU IX
 CI857



Création de l'ATG

Digestion Bam HI ... ATGGATCC..

TACCTAGG..

Digestion Mung Bean 5'... ATG 3' >>> 5' ATG 3'
 3'... TACCTAG 5' >>> 3' TAC 5'

CARTE PHYSIQUE ET GENETIQUE DE p GTI 001

FEUILLE DE REMplacement

53

TABLEAU X

Acc I

ATG ATG ATA AGC AAA AAG TAT ACG CTT

MET MET ILE SER LYS LYS TYR THR LEU

1) 5' ATGATAAGCAAAAAGT 3'

2) 3' TACTATTCTGTTTTCATA 5'

5' ATGATAAGCAAAAAGT 3' oligo "iut"

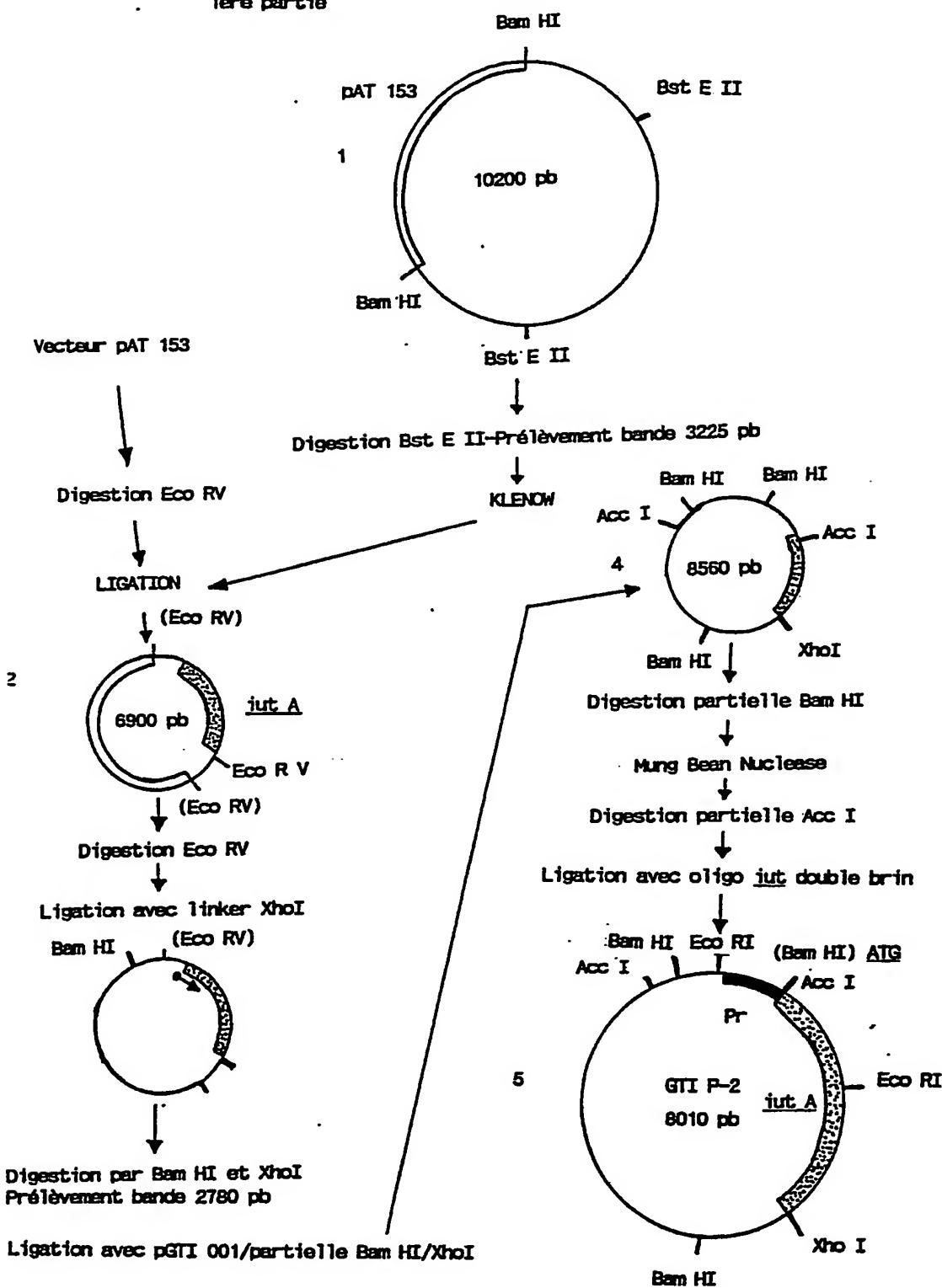
3' TACTATTCTGTTTTCATA 5'

Début du gène iut A et séquence de l'oligonucléotide double brin utilisé pour la mise en phase du gène iut A dans p GTI 001.

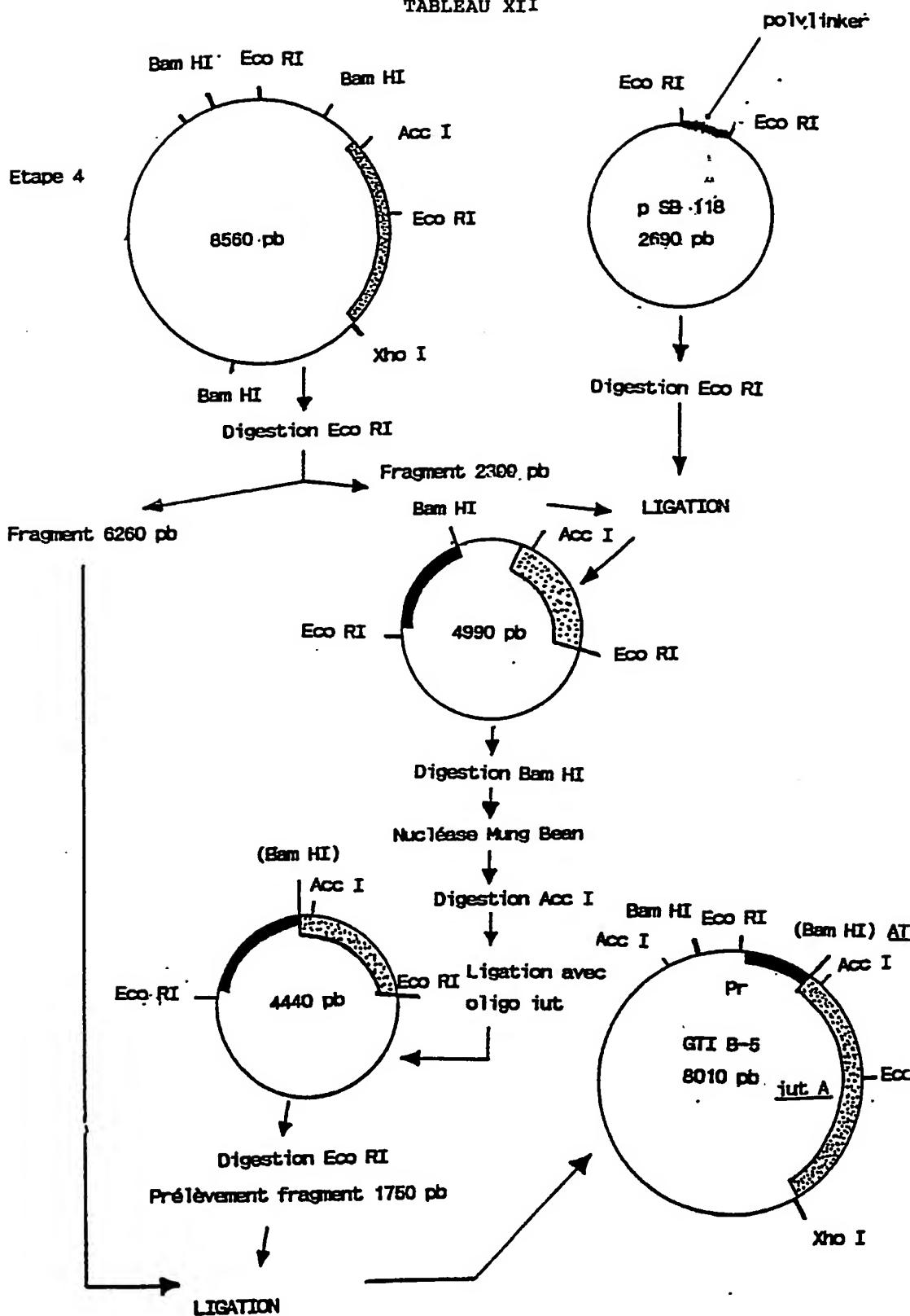
FEUILLE DE REMPLACEMENT

54

TABLEAU XI
STRATEGIE D'INSERTION DU GENE jut A DANS p GTI 001
1ère partie

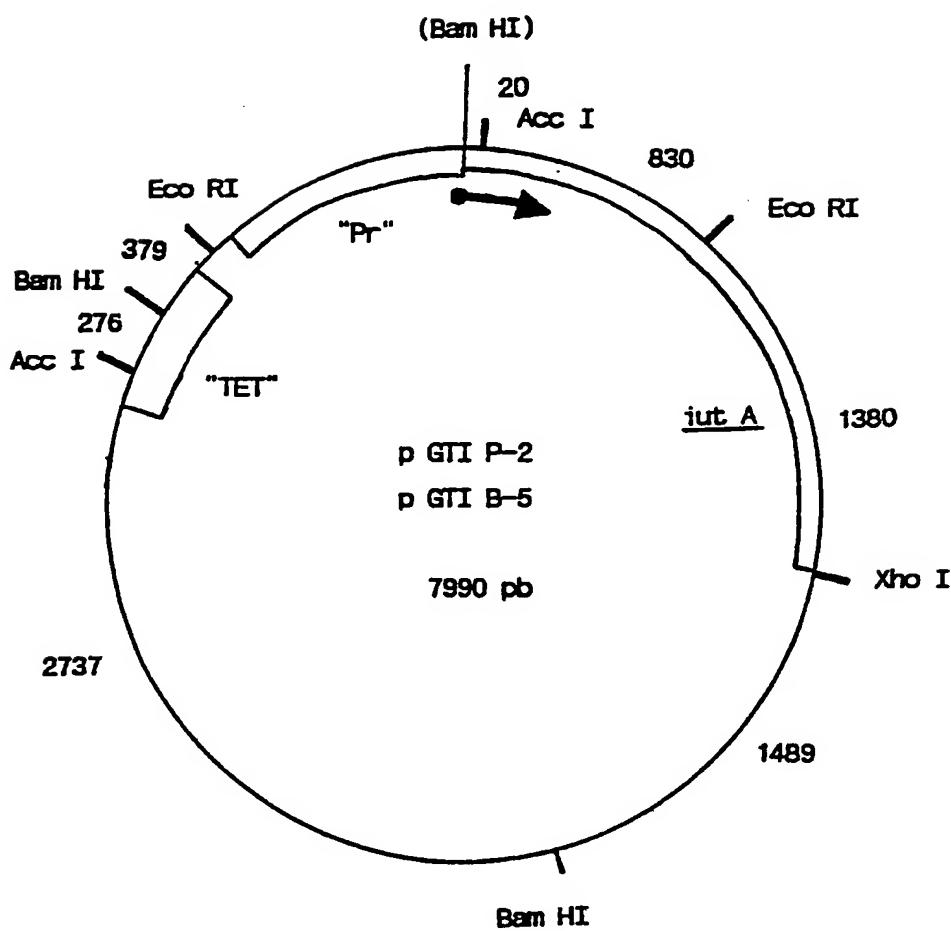


FEUILLE DE REMPLACEMENT

55
TABLEAU XII

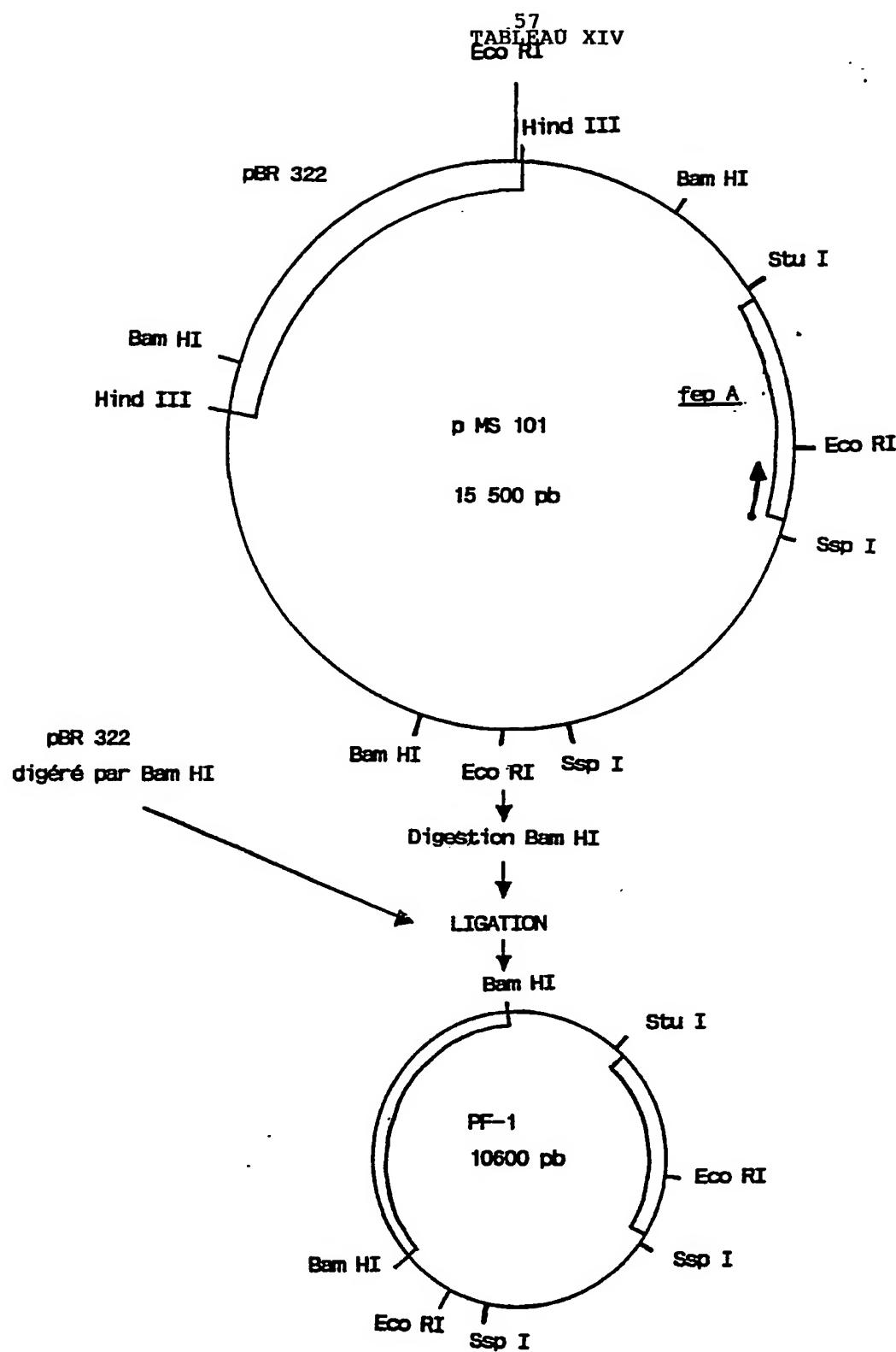
FEUILLE DE REMPLACEMENT

TABLEAU XIII



CARTE DE RESTRICTION DES PLASMIDES GTI P-2 ET GTI B-5

FEUILLE DE REMPLACEMENT



CARTE DE RESTRICTION DE p MS 101 ET CONSTRUCTION DE p F-1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

58
TABLEAU XV

• Début de la séquence du gène fop A

5' G G A A T A A A A C A A T G A A C A A G A A G A T T 3'
 MET ASN LYS LYS ILE

• Séquence à obtenir après mutagénèse :

5' G G A A T A A A A C A G T T A A C A A G A A G A T T 3'
 3' C C T T A T T T G T C A A T T G T T C T T C T A A 5'
 site Hpa I

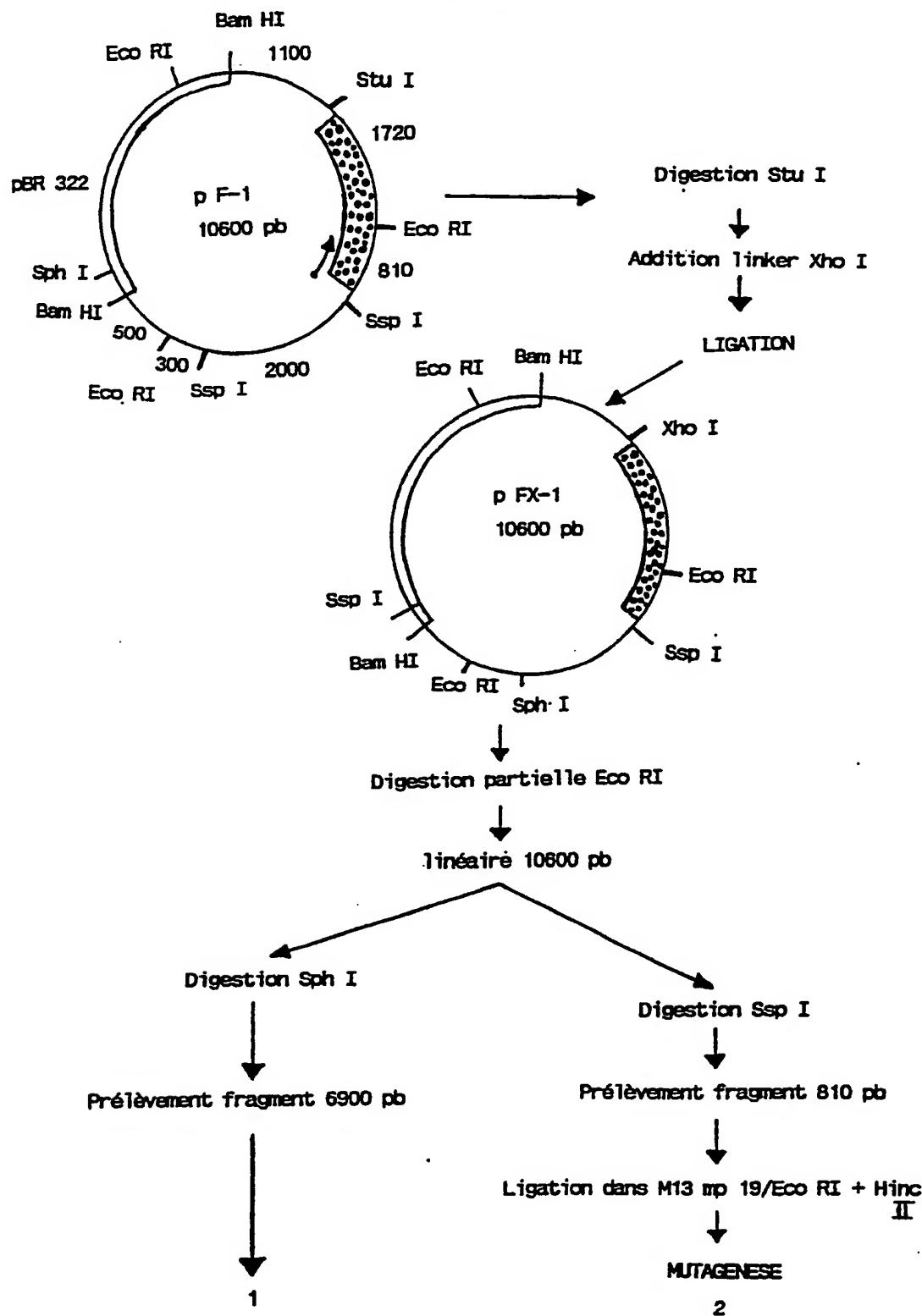
• Oligonucléotide utilisé (27 mer)

5' C T T C T T G T T A A C T G T T T A T T C C 3'

Séquence de l'oligonucléotide de synthèse utilisé
pour la mutagénèse de fop A

59

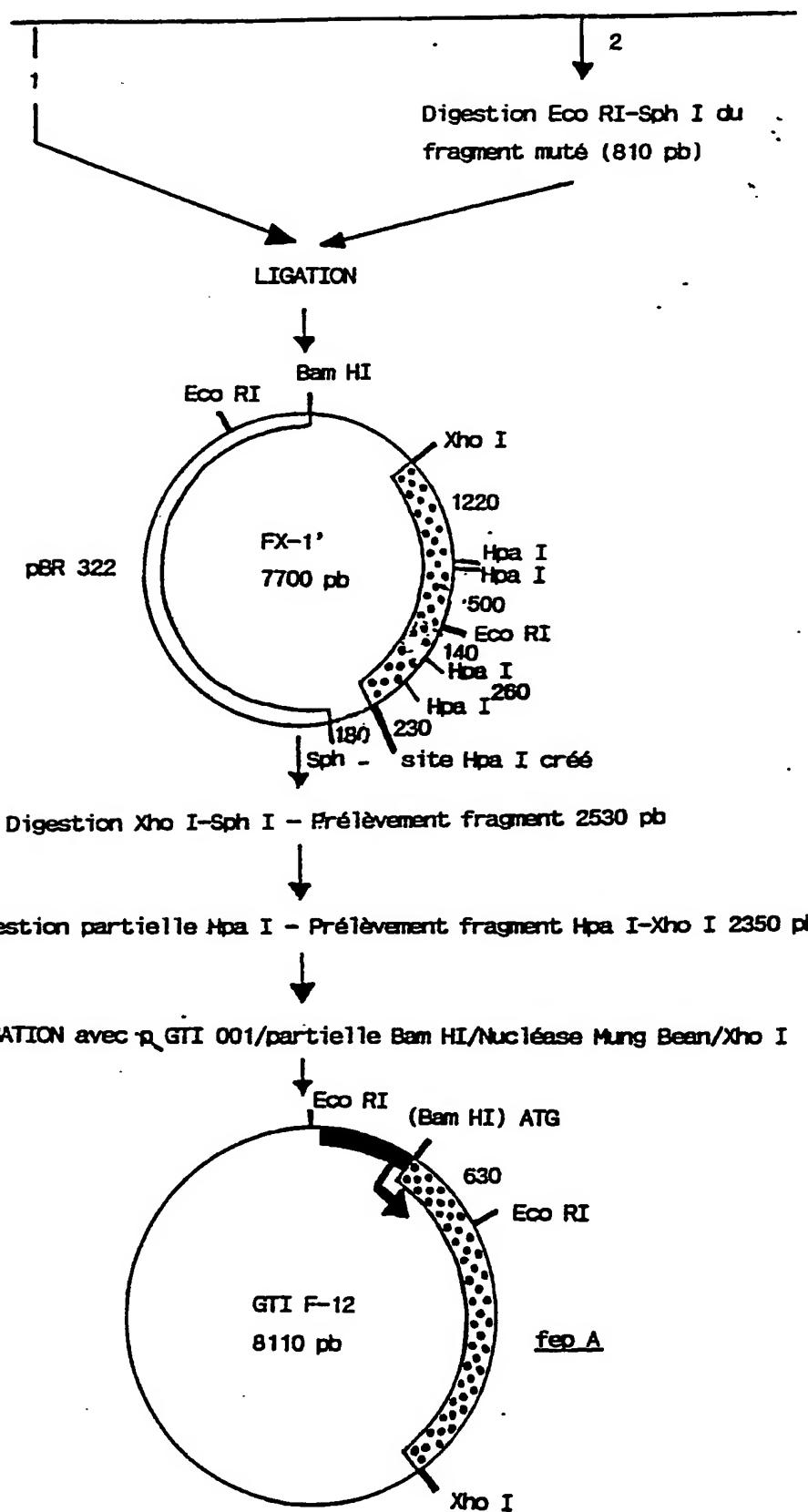
TABLEAU XVI
STRATEGIE D'INSERTION DU GENE fep A DANS p GTI 001
1^{re} partie



FEUILLE DE REMPLACEMENT

60

TABLEAU XVII



BIBLIOGRAPHIE

(1) BINDEREIF A., BRAUN V. et HANTKE, J. *Bacteriol.* 150, 1472-1475 (1982)

(2) BINDEREIF A et NEILANDS I.B., *J. Bacteriol.* 153, 5 1111-1113 (1983)

(3) BIRNBOIM H.C. et DOLY J., *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523 (1979)

(4) BOLIN C.A. et JENSEN A.E., *Infect. Immun.* 55, 1239-1242 (1987)

10 (5) BYERS B.R., p. 111-116, "Iron transport in microbes, plants and animals", G. WINKELMAN, D. VAN DER HELM et J.B. NEILANDS, VCH Publishers Weinheim, FRG.

(6) CODERRE P. et EARHARDT C.F., "Characterization of a plasmid carrying the *Escherichia coli* K12, ent D, fep A, fes 15 et ent F" gènes FEMS *Microbiol. Letters* 25, 111-116 (1984).

(7) COULTON J.W., *Biochim. Biophys. Acta* 717, 154, 162 (1982)

(8) DE GRAAF F.K., TIEZE G.A., WENDELAAR BONGA S. et STOUTHAMER A.H., *J. Bacteriol.* 95, 631-640 (1968)

20 (9) DE GRAAF F.K., GOEDVOLK-DE GROOT et STOUTHAMER A.H., *Biochim. Biophys. Acta*, 221, 566-575 (1970)

(10) ENGWALL E. et PERLMANN, J. *Immunol.* 109, 129-135 (1972)

(11) FLEMING T.P., NAHLIK M.S., NEILANDS J.B. et Mc 25 INTOSH M.A., *Gene*, 34, 47-54 (1985)

(12) FISS E.H., STANLEY-SAMUELSON P. et NEILANDS J.B., *Biochemistry*, 21, 4517-4522 (1982)

(13) GRIFFITHS E., "Iron and infection : molecular, physiological and chemical aspects", J.J. BULLEN et E. GRIF- 30 FITH, JOHN WILEY & SONS LTD, CHICHESTER ENGLAND.

(14) HERRERO M., DE LORENZO V. et NEILANDS J.B., *J. Bacteriol.* 170, 56-64 (1988).

(15) HOLLIFIELD W.E. et NEILANDS, *Biochemistry* 17, 1922-1928 (1978)

35 (16) KADO C.I. et LIU S.T., *J. Bacteriol.* 145, 1365-1373 (1978)

(17) KRONE W.J.A., OUDEGA B., STEGEHUIS F. et DE GRAAF F.K., *J. Bacteriol.* 153, 716-721 (1983).

(18) KRONE W.J.A., STEGEHUIS F., KONINGSTEIN G., VAN DOORN C., ROSENDAL B., DE GRAAF F.K. et OUDEGA B., *FEMS 5 Microbiol.* 26, 153-161 (1985)

(19) LAIRD A.J. et YOUNG I.G., *Gene* 11, 359-366 (1950)

(20) LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARRA L.A. et RANDALL R.J., *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)

(21) LUGTENBERG B., MEIJERS J., PETERS R., VAN DER HOEK 10 P. et VAN ALPHEN L., *FEBS Lett.* 58, 254-258 (1975).

(22) LUNDIGRAN M.D. et KADNER R.J., *J. Biol. Chem.* 261, 10797-10801 (1986)

(23) MANIATIS T., FRITSCH E.F. et SAMBROOK J. (1982), Molecular cloning : on laboratory manual. Cold Spring Harbor 15 Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

(24) NAKAMAYE K. et ECKSTEIN, *Nucl. Acids Res.* 14, 9679-9698 (1986)

(25) OHTSUBO H. et OHTSUBO E., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 615-619 (1978)

20 (26) ROGERS H.J., SYNGE C et WOODS V.E., Antibacterial effect of scandium and indium complexes of enterochelin on Klebsiella pneumoniae. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy* 18, 63-68 (1986)

(27) ROGERNS H.J., "Iron transport in microbes, plants 25 and animals" G. WINKELMAN, D. VAN DER HELM, et J.B. NEILANDS, p. 223-233 (1987)-VCH Publishers, Weinheim, FRG

(28) SANGER F., NICKLEN S. et COULSON A.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977).

(29) SCHNAITMAN C.A., *J. Bacteriol.* 108, 545-552 (1971)

30 (30) SIMON E.H. et TESSMAN I., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 526-532 (1963)

(31) SOUTHERN E., *J. Mol. Biol.* 98, 503-517 (1975)

(32) TAYLOR J.W., SCHMIDT W., CROSSTICK R., OKRUSZEK A. et ECKSTEIN F., *Nucl. Acids Res.* 13, 8749-8764 (1985)

35 (33) TAYLOR J.W., OTT J. et ECKSTEIN F., *Nucl. Acids Res.* 13, 8765-8785 (1985)

(34) TOWBIN H., STAHELIN T. et GORDON J., Proc. Natl. Acad. Sci USA 76, 4350-4354 (1979)

(35) VAN TIEL-MENKVELD G.J., OUDEGA B., KEMPERS O. et DE GRAAF F.K., FEMS, Microbiol. Lett. 12, 373-380 (1981)

5 (36) VAN TIEL-MENKVELD G.J., VELTKAMPF E. et DE GRAAF F.K., J. Bacteriol. 146, 41-48 (1981)

(37) WILLIAMS P.H., infect. Immun. 26, 925-932 (1979)

(38) YANISCH-PERRON C, VIEIRA J. et MESSING J., Gene 33, 103-119 (1985)

REVENDICATIONS.

1. Procédé de culture de bactéries exprimant des protéines de la membrane externe régulées par le fer et dont certaines sont des récepteurs de sidérophores ou de transferrines, utilisables dans une préparation vaccinale, caractérisé en ce que l'on cultive lesdites bactéries dans un milieu dans lequel on réduit, à l'aide d'une protéine forte chélatrice du fer, telle qu'une lactoferrine, la teneur en fer à un niveau permettant d'obtenir une expression accrue desdites protéines récepteurs suffisante, pour induire, lorsque lesdites bactéries sont utilisées dans un vaccin, la formation d'anticorps empêchant la reconnaissance spécifique des sidérophores par leurs récepteurs.
15 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les bactéries appartiennent au groupe formé par les enterobactéries des familles Escherichia coli, Klebsiella, Salmonella thyphimurium, Shigella.
20 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que les sidérophores excrétés par les bactéries, sont des sidérophores aérobactine et/ou entérobactine.
25 4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que les protéines exprimées sont les protéines Iut A et/ou Fep A.
30 5. Vaccin anti-bactéries septicémiques, caractérisé en ce qu'il contient à titre de principe actif, des antigènes comportant des bactéries entières obtenues par culture dans un milieu dans lequel on réduit la teneur en fer à un niveau permettant d'obtenir une expression accrue de protéines de la membrane externe régulées par le fer et dont certaines sont des récepteurs de sidérophores ou de transferrines, ou des fragments de ces bactéries, ou des protéines récepteurs de transferrines ou sidérophores, et notamment les protéines Iut A et Fe A, extraites de ces bactéries.
35 6. Vaccin selon la revendication 5, caractérisé en ce

que lesdites bactéries sont des bactéries obtenues par le procédé sel n l'une quelconque des revendications 1 à 4.

5 7. Bactéries exprimant en quantités accrues au moins une protéine de la membrane externe régulée par le fer et constituant un récepteur de transferrine ou sidérophore, caractérisées en ce qu'elles comportent des vecteurs d'expression recombinants exprimant la ou lesdites protéines.

10 8. Bactéries selon la revendication 7., caractérisées en ce que les gènes exprimés dans lesdits vecteurs appartiennent au système d'expression des protéines de la membrane externe régulées par le fer faisant partie du groupe formé par les entérobactéries des familles E. coli, Klebsiella, Salmonella thyphimurium, Shigella.

15 9. Bactéries selon la revendication 8.; caractérisées en ce que lesdites protéines appartiennent aux systèmes des sidérophores aérobactine et/ou entérobactine.

10 10. Bactéries selon la revendication 9., caractérisées en ce que les protéines synthétisées sont les protéines Iut A et/ou Fep A et/ou leurs précurseurs.

15 11. Bactéries selon la revendication 10., caractérisées en ce que la protéine Iut A est obtenue par un procédé consistant, notamment, à isoler la partie plasmidique d'une souche d'E. coli ou d'une autre entérobactérie portant 20 l'opéron aérobactine, à séparer de la partie plasmidique un fragment portant le gène iut A, à liguer ledit fragment avec un vecteur de clonage, à insérer le gène iut A cloné dans un vecteur d'expression, et à faire exprimer la protéine Iut A par culture des clones.

25 30 12. Bactéries selon la revendication 11., caractérisées en ce que le vecteur d'expression utilisé pour exprimer la protéine Iut A a son origine de réplication placée sous le contrôle du promoteur tac et en ce que le gène à exprimer est sous le contrôle du promoteur fort "Pr" dont le 35 répresseur est thermosensible.

13. Bactéries selon la revendication 10, caractérisées en ce que la protéine Fep A est obtenue par clonage du gène fep A dans le vecteur d'expression défini dans la revendication 11 ou 12.

5 14. Procédé de synthèse d'IROMPs et notamment des protéines Iut A et Fep A ou leurs précurseurs proIut A et proFep A, caractérisé en ce que l'on cultive dans un milieu approprié, des clones définis dans les revendications 11 à 13 d'abord à une température inférieure à 32°C puis à 42°C
10 pour induire l'expression des gènes iut A et fep A.

15. Vaccin anti-bactéries septicémiques, caractérisé en ce qu'il contient à titre de principe actif des IROMPs et notamment, les protéines Iut A et/ou Fep A et/ou les précurseurs de ces protéines extraits de la membrane externe
15 ou du cytoplasme des bactéries recombinantes, selon l'une quelconque des revendications 7 à 13.

16. Vaccin selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il contient lesdites bactéries recombinantes ou des fragments de ces bactéries.

PL 1/2

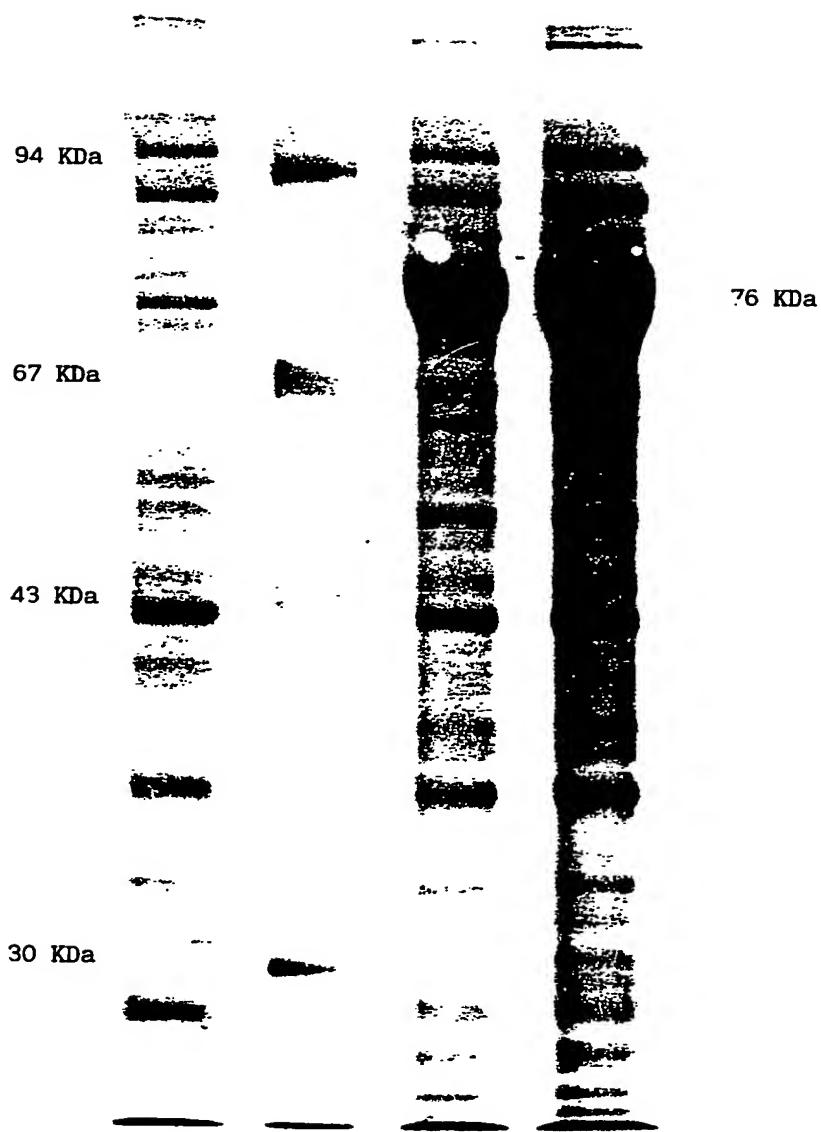


Figure 1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

PL 2/2

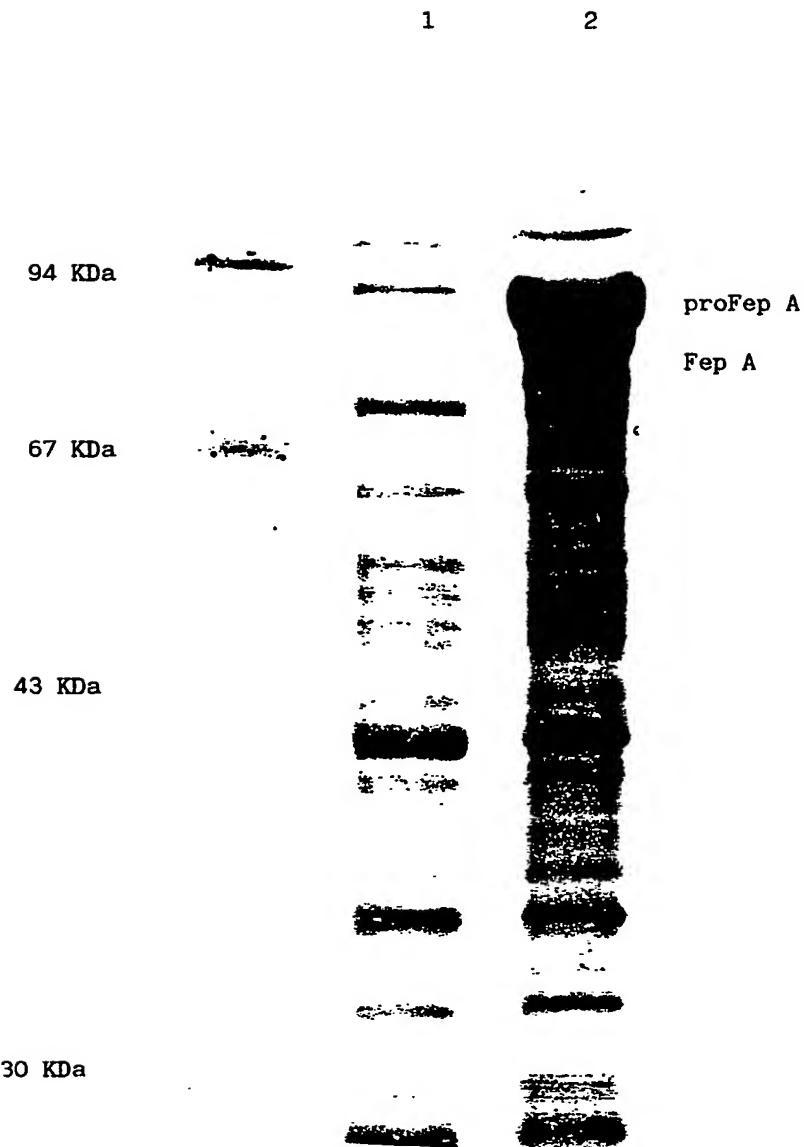


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/FR 90/00183

I. CLASSIFICATION & SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl. ⁵ C 12 N 5/00, A 61 K 39/108, 39/112, C 12 N 15/31.

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

| Classification System | Classification Symbols |
|--|------------------------|
| Int.Cl. ⁵ | C 12 N , A 61 K |
| Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸ | |

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT*

| Category ⁹ | Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹² | Relevant to Claim No. ¹³ |
|-----------------------|--|-------------------------------------|
| X | Chemical Abstracts, volume 97, 1982, (Columbus, Ohio, US), A. Bindereif et al.: "The cloacin receptor of CoIV-bearing Escherichia coli is part of the iron(3+)-aerobactin transport system", see page 291, abstract 35849p & J. Bacteriol. 1982, 150(3), 1472-5 (cited in the application) | 1-4 |
| Y | -- | 5,6 |
| Y | Biological Abstracts, volume 84, no. 3, 1987, (Philadelphia, PA, US), C.A. Bolin et al.: "Passive immunization with antibodies against iron-regulated outer membrane proteins protects turkeys from Escherichia coli septicemia", | 5,6 |
| | | ./. |

* Special categories of cited documents: ¹⁰

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

31 May 1990 (31.05.90)

Date of Mailing of this International Search Report

3 July 1990 (03.07.90)

International Searching Authority

European Patent Office

Signature of Authorized Officer

II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

| Category * | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No |
|------------|--|----------------------|
| | see abstract 25347 & INFECT IMMUN 55(5): 1239-1242. 1987. (cited in the application) -- | |
| X | Chemical Abstracts, volume 103, 1985, (Columbus, Ohio, US), E. Griffiths et al.: "Synthesis of aerobactin and a 76,000-dalton iron- regulated outer membrane protein by Escherichia coli K-12-Shigella flexneri hybrids and by enteroinvasive strains of Escherichia coli", see page 361, abstract 68057z & Infect. Immun. 1985, 49(1), 67-71 (cited in the application) -- | 1-3 |
| X | Chemical Abstracts, volume 107, 1987, (Columbus, Ohio, US), C.L. Marolda et al.: "Flanking and internal regions of chromosomal genes mediating aerobactin iron uptake systems in enteroinvasive Escherichia coli and Shigella flexneri", see page 161, abstract 148286w, & J. Gen. Microbiol. 1987, 133(8), 2269-78 (cited in the application) -- | 1-3 |
| A | Chemical Abstracts, volume 98, 1983, (Columbus, Ohio, US), A. Bindereif et al.: "Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid CoIV", see page 176, abstract 12060v, & J. Bacteriol. 1983, 153(2), 1111-13 (cited in the application) -- | 1,7,14 |
| A | Chemical Abstracts, volume 105, 1986, (Columbus, Ohio, US), V. de Lorenzo et al.: "Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid CoIV-K30 in Escherichia coli K-12", see page 154, abstract 92124 f, J. Bact. 1986, 165(2), 570-8 -- | 1-4 |
| | | ./. |

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

| Category * | Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to Claim No |
|------------|---|----------------------|
| A | Chemical Abstracts, volume 95, 1981, (Columbus, Ohio, US), P.J. Warner et al.: "CoIV plasmid- specified aerobactin synthesis by invasive strains of <i>Escherichia coli</i> ", see page 306, abstract 93711g & Infect. Immun. 1981, 33(2), 540 5 -- | 1-3 |
| A | Biological Abstracts, volume 81, no. 9, 1986, (Philadelphia, PA, US), M.D. Magazin et al.: "Cloning of the gene coding for the outer membrane receptor protein for ferric pseudo- bactin, a siderophore from a plant growth-promoting <i>Pseudomonas</i> strain", see abstract 81571, & J. Biol. Chem. 261(2) 795-799 -- | 1,7 |
| A | Biological Abstracts, volume 77, 1984, (Philadelphia, PA, US), L. Fecker et al.: "Cloning and expression of the fhu genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by <i>Escherichia coli</i> ", see abstract 75003 & J. Bacteriol. 156(3): 1301-1314. ----- | 7 |

RAPP RT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N° PCT/FR 90/00183

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁵

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

CIB : C 12 N 5/00, A 61 K 39/108, 39/112, C 12 N 15/31

II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ

Documentation minimale consultée ⁶

| Système de classification | Symbol de classification |
|---------------------------|--------------------------|
| CIB ⁵ | C 12 N , A 61 K |

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁷

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰

| Catégorie ⁸ | Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹² | N° des revendications visées ¹³ |
|------------------------|---|--|
| X | Chemical Abstracts, volume 97, 1982, (Columbus, Ohio, US), A. Bindereif et al.: "The cloacin receptor of CoIV-bearing Escherichia coli is part of the iron(3+)-aerobactin transport system", voir page 291, résumé 35849p & J. Bacteriol. 1982, 150(3), 1472-5 (cité dans la demande) | 1-4 |
| Y | -- | 5,6 |
| Y | Biological Abstracts, volume 84, no. 3, 1987, (Philadelphia, PA, US), C.A. Bolin et al.: "Passive immunization with antibodies against iron-regulated outer membrane proteins protects turkeys from Escherichia coli septicemia", | 5,6 |

* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹

- « A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- « E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- « L » document pouvant lancer un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- « O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- « P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- « T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- « X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- « Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- « & » document qui fait partie de la même famille de brevets

IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

31 mai 1990

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

- 3. 07. 90

Administration chargée de la recherche internationale

OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé

M. PEIS

M. PEIS

| III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE) | | |
|---|--|------------------------------|
| Catégorie | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents | N° des revendications visées |
| | voir résumé 25347, & INFECT IMMUN 55(5): 1239-1242. 1987. (cité dans la demande) -- | |
| X | Chemical Abstracts, volume 103, 1985, (Columbus, Ohio, US), E. Griffiths et al.: "Synthesis of aerobactin and a 76,000-dalton iron-regulated outer membrane protein by Escherichia coli K-12-Shigella flexneri hybrids and by enteroinvasive strains of Escherichia coli", voir page 361, résumé 68057z, & Infect. Immun. 1985, 49(1), 67-71 (cité dans la demande) -- | 1-3 |
| X | Chemical Abstracts, volume 107, 1987, (Columbus, Ohio, US), C.L. Marolda et al.: "Flanking and internal regions of chromosomal genes mediating aerobactin iron uptake systems in enteroinvasive Escherichia coli and Shigella flexneri", voir page 161, résumé 148286w, & J. Gen. Microbiol. 1987, 133(8), 2269-78 (cité dans la demande) -- | 1-3 |
| A | Chemical Abstracts, volume 98, 1983, (Columbus, Ohio, US), A. Bindereif et al.: "Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid CoIV", voir page 176, résumé 120604v, & J. Bacteriol. 1983, 153(2), 1111-13 (cité dans la demande) -- | 1,7,14 |
| A | Chemical Abstracts, volume 105, 1986, (Columbus, Ohio, US), V. de Lorenzo et al.: "Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid CoIV-K30 in Escherichia coli K-12", voir page 154, résumé 92124f, J. Bacteriol. 1986, 165(2), 570-8 -- | 1-4 |

. / .

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS

(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICIES SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents | N° des revendications visées |
|-------------|---|------------------------------|
| A | Chemical Abstracts, volume 95, 1981, (Columbus, Ohio, US), P.J. Warner et al.: "CoIV plasmid-specified aerobactin synthesis by invasive strains of <i>Escherichia coli</i> ", voir page 306, résumé 93711g, & Infect. Immun. 1981, 33(2), 540 5 -- | 1-3 |
| A | Biological Abstracts, volume 81, no. 9, 1986, (Philadelphia, PA, US), M.D. Magazin et al.: "Cloning of the gene coding for the outer membrane receptor protein for ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth-promoting <i>Pseudomonas</i> strain", voir résumé 81571, & J. Biol. Chem. 261(2) 795-799 -- | 1,7 |
| A | Biological Abstracts, volume 77, 1984, (Philadelphia, PA, US), L. Fecker et al.: "Cloning and expression of the fhu genes involved in iron(III)-hydroxamate uptake by <i>Escherichia coli</i> ", voir résumé 75003, & J. Bacteriol. 156(3): 1301-1314. ----- | 7 |